

Molekularpathologische Untersuchung primärer kardialer Angiosarkome

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Dipl. Humanbiologin Kristin Kunze
aus Sondershausen

Gießen 2014

Dekan: Prof. Dr. Holger Zorn

Erster Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bräuninger

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	vi
Tabellenverzeichnis.....	vii
Abkürzungsverzeichnis	viii
1. Einleitung.....	1
1.1 Sarkome	1
1.2 Angiosarkome	2
1.2.1 Ätiologie.....	2
1.2.2 Histomorphologie und Immunhistochemie	2
1.2.3 Entstehung und Entwicklung der Angiosarkome	3
1.2.3.1 Endotheliale Zellen und Angiogenese	3
1.2.3.2 Pathogenese	5
1.2.4 Therapie	6
1.2.5 Primäre kardiale Angiosarkome	7
1.3 Neue genomweite Analyseverfahren zum Nachweis genomischer Aberrationen	8
1.4 Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material.....	12
2.1 Patientenproben	12
2.2 Geräte	12
2.3 Verbrauchsmaterialien	14
2.4 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme	15
2.5 Zellkultur-Medien und -Reagenzien	16
2.6 Lösungen und Puffer	17
2.7 Verwendete Kits	18
2.8 Primer	19
2.9 Antikörper	21
3. Methoden	23
3.1 DNA- und RNA-Isolation aus den Patientenproben	23
3.1.1 DNA-Isolation	23
3.1.2 RNA-Isolation	23
3.1.3 Konzentrationsbestimmung.....	24
3.2 SNP-Array Analysen	24
3.2.1 Qualitätskontrolle der DNA-Proben.....	25
3.2.2 DNA-Rekonstitution.....	26
3.2.3 Denaturierung und Amplifikation der rekonstituierten DNA	27
3.2.4 Fragmentierung und Denaturierung der amplifizierten DNA.....	27
3.2.5 Hybridisierung der fragmentierten DNA auf den BeadChip	28

3.2.6 Einzel-Basen Verlängerung und Färbung des BeadChips	28
3.2.7 Auswertung der SNP-Array Daten	28
3.3 Immunhistochemie	29
3.4 miRNA Expressionsanalysen	30
3.4.1 Qualitätskontrolle mittels TaqMan miRNA-Einzelassay	31
3.4.2 TaqMan Low Density Assay	33
3.4.3 Auswertung der miRNA Expressionsdaten	34
3.5 Next Generation Sequencing mittels der Ion Torrent Plattform	35
3.5.1 Herstellung der DNA-Library	36
3.5.2 Klonale Amplifikation	39
3.5.3 Sequenzierungsreaktion	42
3.5.4 Auswertung der NGS Daten	43
3.6 PCR und konventionelle Sequenzierung	44
3.6.1 Fast-PCR Reaktion	44
3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese	44
3.6.3 Aufreinigung des PCR-Produkts und Sequenzierungs-PCR	45
3.7 Mutagenese	46
3.7.1 Plasmid-Methylierung und Mutagenese-Reaktion	47
3.7.2 Rekombinations-Reaktion	48
3.7.3 Transformation und Aufreinigung des mutierten Plasmids	49
3.7.4 Kontrolle der Transformation und Mutagenese	50
3.8 Zellkultur	50
3.8.1 Kultivierung der HEK293-Zelllinie und der primären endothelialen Zellen	50
3.8.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen	51
3.9 Nachweis von Proteinen durch Western Blot	52
3.9.1 Herstellung der Zelllysate	52
3.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	52
3.9.3 Proteintransfer	53
3.9.4 Proteindetektion	53
3.10 Funktionelle Untersuchungen mit HEK293-Zellen und primären endothelialen Zellen ..	54
3.10.1 Transiente Transfektion	54
3.10.2 IP-One ELISA	54
3.10.3 Migrations- und Invasionsassay	56
3.10.4 Durchflussszytometrie	57
3.10.4.1 Transfektionseffizienz	57
3.10.4.2 Zellzyklus-Analyse	57
3.10.4.3 Apoptose-Assay	58
3.10.5 Liganden-Stimulation	58
3.10.6 Phosphatase-Inhibierung	59

4. Ergebnisse	60
4.1 SNP-Array-Analysen	60
4.2 miRNA Expressionsanalysen	66
4.3 Next Generation Sequencing	69
4.3.1 Auswertung mittels Variant Caller	69
4.3.2 Identifikation rekurrenter Mutationen in <i>PLCG1</i> , <i>KDR</i> und <i>MLL2</i>	70
4.3.2.1 Vergleich mit Angiosarkomen anderer Lokalisation	72
4.4 Funktionelle Untersuchungen zur Auswirkung der PLCγ1-R707Q-Mutation	73
4.4.1 Die R707Q-Mutation führt zu einer verringerten Phosphorylierung von PLCγ1	74
4.4.2 Die R707Q-Mutation aktiviert PLCγ1	76
4.4.3 Die R707Q-Mutation begünstigt das Zellüberleben	78
4.4.4 Die R707Q-Mutation fördert die Migration und Invasion endothelialer Zellen	83
4.5 Untersuchung der PLCγ1-Expression in den Patientenproben	86
5. Diskussion	87
5.1 Screening der primären kardialen Angiosarkome	87
5.1.1 SNP-Array Analysen	87
5.1.2 miRNA Expression	89
5.1.3 Next Generation Sequencing	91
5.1.3.1 Die identifizierten Mutationen betreffen vor allem Signalwege und Chromatin- modifizierende Proteine.....	92
5.2 Die Rolle der PLCγ1-R707Q Mutation bei der Pathogenese primärer kardialer Angiosarkome	95
5.3 Fazit und Ausblick	99
6. Zusammenfassung	101
7. Summary	103
Anhang	105
Literaturverzeichnis	115
Lebenslauf	122
Publikationen	123
Danksagung	124
Selbstständigkeitserklärung	125

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Immunhistochemische Färbung mit CD31.	3
Abb. 2: Darstellung der Gefäßwände.	3
Abb. 3: Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) durch endotheliale Zellen.	4
Abb. 4: Einzel-Basen Verlängerung zur Detektion der SNPs.	25
Abb. 5: TaqMan basierte real-time PCR.	31
Abb. 6: DNA-Fragmente binden über den Adapter P1 an die ISPs.	39
Abb. 7: Beladung des 8-Well Streifens für die Aufreinigung mit dem Ion OneTouch ES.	40
Abb. 8: Darstellung des Chip-Aufbaus anhand eines Mikrowells.	42
Abb. 9: Darstellung des PLCy1-Expressionsvektors von Origene.	46
Abb. 10: Zielgerichtete in-vitro Mutagenese-Reaktion.	47
Abb. 11: Grafische Darstellung des Migrations- und Invasionsassays.	56
Abb. 12: Rekurrenter Zugewinn des gesamten q-Arms von Chromosom 1.	62
Abb. 13: Der rekurrente Zugewinn auf Chromosom 4 betrifft KIT und KDR.	63
Abb. 14: Die kardialen Sarkome NOS weisen komplexere numerische Aberrationen auf.	64
Abb. 15: Hierarchische Clusteranalyse und Heatmap-Darstellung der Angiosarkome und Sarkome NOS.	67
Abb. 16: Lokalisation der <i>PLCG1</i> -Mutation in der hochkonservierten cSH2-Domäne.	72
Abb. 17: Bestimmung der Transfektionseffizienz mit dem eGFP Kontroll-Plasmid.	73
Abb. 18: Die PLCy1-R707Q Mutation bewirkt eine geringere Phosphorylierung von Y783.	75
Abb. 19: PLCy1-R707Q wird an Y783 stärker dephosphoryliert als der WT.	76
Abb. 20: Die PLCy1-R707Q-Mutation führt zur Aktivierung des RAS/MEK/ERK-Signalweges.	77
Abb. 21: Die PLCy1-R707Q-Mutation aktiviert den IP3-Signalweg.	78
Abb. 22: Die PLCy1-R707Q-Mutation bewirkt eine geringe Zunahme der Zellzahl im Vergleich zum Wildtyp.	79
Abb. 23: Die PLCy1-R707Q-Mutation hat keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung.	80
Abb. 24: Durchflusszytometrische Analyse des Apoptose-Assays.	81
Abb. 25: Die PLCy1-R707Q-Mutation erhöht die Apoptoseresistenz endothelialer Zellen.	82
Abb. 26: Die PLCy1-R707Q-Mutation bewirkt eine verstärkte Aktivierung von Cofilin.	83
Abb. 27: Die PLCy1-R707Q-Mutation erhöht die Migration und Invasion endothelialer Zellen.	85
Abb. 28: Nachweis der PLCy1-Expression mittels Immunhistochemie.	86
Abb. 29: TaqMan Human MicroRNA Array A.	105

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über die numerischer Aberrationen von 8 primären kardialen Angiosarkomen.	61
Tab. 2: Differentiell exprimierte miRNAs in kardialen Angiosarkomen im Vergleich zu kardialen Sarkomen NOS.	68
Tab. 3: Missense- und nonsense-Mutationen in 6 primären kardialen Angiosarkomen, die mittels tNGS identifiziert und durch konventionelle Sequenzierung bestätigt wurden.....	71
Tab. 4: Die PLCy1-R707Q-Mutation erhöht die Migration und Invasion endothelialer Zellen. ...	84
Tab. 5: Liste von 409 häufig mutierten Tumorsuppressor- und Onkogenen, die mittels Comprehensive Cancer Panel auf bekannte Mutations-Hotspots untersucht wurden.	106
Tab. 6: Durchschnittliche Delta-Ct-Werte, Signifikanzen und Veränderungsfaktoren der differentiell exprimierten miRNAs.....	108
Tab. 7: Übersicht über die einzelnen tNGS-Läufe des Ion PGM Systems.	109
Tab. 8: Mittels Variant Caller identifizierte somatische Varianten der 6 kardialen Angiosarkome, die durch tNGS auf Mutationen untersucht wurden.	110
Tab. 9: Detaillierte Übersicht der 15 bestätigten missense- und nonsense Mutationen in 6 kardialen Angiosarkomen.....	114

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
aq. dest.	Aqua destillata
BAF	<i>B Allele Frequency</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bspw.	beispielsweise
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CMV	Cytomegalievirus
cnLOH	<i>copy neutral loss of heterozygosity</i>
cSH2	C-terminale SH2 Domäne
Ct	<i>cycle threshold</i>
DAG	1,2-Diacylglycerin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECGM	endothelial cell growth medium
ECGM2	endothelial cell growth medium 2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FFPE	Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet
FW	<i>forward</i>
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney 293 cells</i>
HRP	Merrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IGV	<i>Integrative Genomic Viewer</i>
IHC	Immunhistochemie
IP1	Inositolmonophosphat
IP3	Inositoltrisphosphat
ISP	<i>Ion Sphere Particle</i>
kb	Kilo-Basenpaare
LS	<i>lower strand</i>

mAb	<i>monoclonal antibody</i>
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i>
n	Anzahl
NGS	next generation sequencing
NOS	<i>not otherwise specified</i>
nSH2	N-terminale SH2 Domäne
OD	optische Dichte
pAb	<i>polyclonal antibody</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PET	Polyethylenterephthalat
PGM	<i>personal genome machine</i>
PI	Propidiumiodid
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
RV	reverse
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SNV	<i>single nucleotide variants</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TLDA	TaqMan Low Density Assay
tNGS	targeted next generation sequencing
u.a.	unter anderem
US	<i>upper strand</i>
UTR	untranslatierte Region
vs.	versus
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
Y783	Tyrosin 783
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Sarkome

Sarkome sind sehr seltene, heterogene Tumore mesenchymalen Ursprungs, die nur 1% aller malignen Tumorerkrankungen ausmachen (1). Sie können aus den Knochen, den Muskeln, dem Endothel oder aus dem Binde- und Stützgewebe hervorgehen und somit überall im Körper entstehen (2). Je nach ihrer Lokalisation werden die Sarkome daher in Knochen- und Knorpelsarkome, Ewing-Sarkome oder Weichteilsarkome unterteilt (1; 3). Am häufigsten werden die Weichteilsarkome diagnostiziert, die bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 65 Jahren etwas häufiger bei Männern als bei Frauen auftreten (1). Sie werden vor allem in den Extremitäten (59%), im Rumpf (19%), im Retroperitoneum (15%) oder im Kopf- und Halsbereich (9%) diagnostiziert (3). Derzeitig sind etwa 50 histologische Subtypen der Weichteilsarkome bekannt, wie etwa Fibrosarkome (ausgehend vom Bindegewebe), Rhabdomyosarkome (ausgehend von der quergestreiften Muskulatur), Leiomyosarkome (ausgehend von der glatten Muskulatur) oder Angiosarkome (ausgehend von Endothelien) (2).

Die Sarkome haben ihren Ursprung wahrscheinlich überwiegend in mesenchymalen Stammzellen (engl.: *mesenchymal stem cells*, MSC), die auch im Erwachsenenalter noch im Knochenmark vorhanden sind. Sie besitzen die Fähigkeit in verschiedene Zelltypen zu differenzieren und tragen zur Erneuerung von Knochen, Knorpel, Gefäßen oder Muskeln bei. Genetische Veränderungen der MSC können die Ausdifferenzierung verhindern, wodurch die Zellen im Zustand proliferierender Vorläuferzellen verbleiben, was die Entstehung der Sarkome begünstigt (4; 5; 6).

Anhand der chromosomalen Aberrationen können Sarkome in zwei Gruppe unterteilt werden: diejenigen mit einem komplexen Karyotyp und jene mit nahezu normalem Karyotyp. Sarkome, die nur wenige numerische Aberrationen aufweisen, zeigen vermehrt chromosomale Translokationen, die vor allem Transkriptionsfaktoren betreffen. So wird bspw. bei den Ewing-Sarkomen häufig eine Fusion des *EWSR1*-Gens mit dem *FLI-1*-Gen nachgewiesen. Das EWS/FLI-1-Fusionsprotein wirkt als onkogener Transkriptionsfaktor (7; 8). Sarkome, mit einem komplexen Karyotyp weisen hingegen meist keine Translokationen auf, dafür aber vermehrt Mutationen im Retinoblastom-Protein und im p53-Signalweg. Darüber hinaus werden, wie in anderen Tumorentitäten auch, in den meisten Sarkomen Aberrationen nachgewiesen, die zu Veränderungen in Rezeptor-Tyrosinkinase-vermittelten Signalwegen führen. Beispielsweise ist der c-KIT-Signalweg bei den gastrointestinalen Stromatumoren, der PDGFR-Signalweg bei den Osteosarkomen und der IGF1- oder cMET-Signalweg bei den Rhabdomyosarkomen verstärkt aktiviert (7).

1.2 Angiosarkome

Angiosarkome werden mit einer Inzidenz von 0,01/100.000/Jahr nur sehr selten diagnostiziert und machen lediglich 2% aller Weichteilsarkome aus. Da sie vom Endothel der Gefäße ausgehen werden sie zu den malignen vaskulären Tumoren gezählt und sind mit einer schlechten Prognose und einer 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 35% assoziiert (9; 10).

1.2.1 Ätiologie

Angiosarkome entstehen meist spontan, wobei vaskuläre Läsionen die Entstehung von Angiosarkomen begünstigen können. Dazu zählt das Stewart-Treves Syndrom, bei dem sich aus einem chronischen Lymphödem, verursacht durch Brustentfernung aufgrund von Brustkrebs, ein Angiosarkom entwickelt (9; 11). In 3% der Fälle treten Angiosarkome im Zusammenhang mit Erkrankungen auf, die durch genetische Prädispositionen entstehen, wie etwa ein Retinoblastom oder die Hauterkrankung Xeroderma Pigmentosum (11). Ein Drittel der Angiosarkome, die in der Leber auftreten, konnten mit Umwelteinflüssen in Verbindung gebracht werden, wie etwa die Belastung durch Polyvinylchlorid (PVC). Darüber hinaus erhöht eine Strahlentherapie das Risiko für die Entstehung von Angiosarkomen. Dies konnte vor allem bei Brustkrebspatienten beobachtet werden, bei denen sich 5-10 Jahre nach der Radiotherapie Angiosarkome in der Brust entwickelten (9; 11).

1.2.2 Histomorphologie und Immunhistochemie

Typisch für Angiosarkome sind abnormale und pleomorphe Zellen, die rundlich, mehrkantig oder spindelförmig sein können. Abnormale endotheliale Zellen bilden vaskuläre Hohlräume, die häufig von Monozyten infiltriert sind und die kapillarartigen Strukturen bilden ein anastomosierendes Netzwerk von Sinusoiden (9; 10). Mit dem Fortschreiten der Krankheit werden die zellulären Strukturen immer diffuser, mitotische Zellen nehmen zu und nekrotische Areale sind vermehrt zu finden (9).

Zur Differenzierung zwischen Angiosarkomen und anderen Sarkomentitäten werden immunhistochemische Färbungen durchgeführt, wobei die Färbungen aufgrund der Heterogenität der Angiosarkome variieren. Es werden vor allem endotheliale Marker verwendet, wie z.B. der endotheliale Oberflächenmarker CD 31 (Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül), wodurch sich vaskuläre Neoplasien nachweisen lassen (Abb. 1) (12).

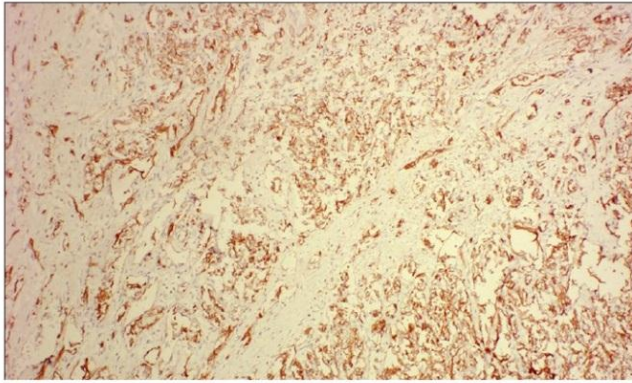


Abb. 1: Immunhistochemische Färbung mit CD31.

Durch die Färbung mit dem endothelialen Oberflächenmarker CD31 können vaskuläre Tumore identifiziert werden. Quelle: Patel (12).

1.2.3 Entstehung und Entwicklung der Angiosarkome

1.2.3.1 Endotheliale Zellen und Angiogenese

Die Angiosarkome gehören zur Gruppe der vaskulären Tumore, da sie vom Endothel der Gefäße ausgehen (9). Das Endothel wird aus einer einzelnen Schicht endothelialer Zellen gebildet und kleidet alle Blutgefäße aus (Abb. 2). Die endothelialen Zellen regulieren den Stoffaustausch zwischen dem Blut und dem umliegenden Gewebe und sind an der Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) sowie an der Wundheilung beteiligt (13). Im Normalzustand

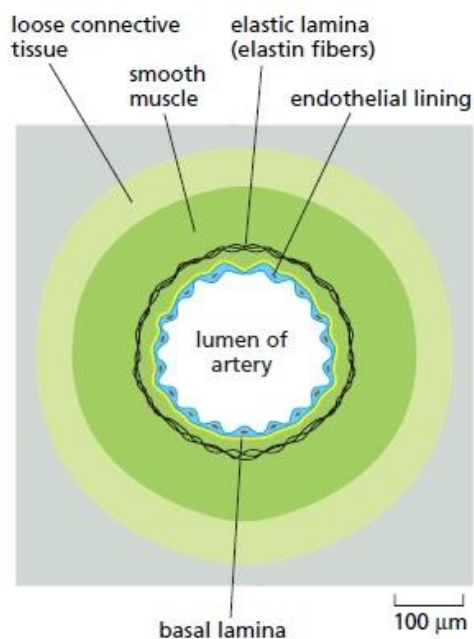


Abb. 2: Darstellung der Gefäßwände.

Endotheliale Zellen kleiden die Gefäße zum Gefäßlumen hin einschichtig aus, separiert von der glatten Muskulatur durch die Basalmembran. Quelle: Molecular Biology of the Cell (13).

bilden die endothelialen Zellen eine einheitliche Schicht und sind durch Adhäsionsproteine (Cadherine und Claudine) miteinander verbunden (14).

Eine Balance zwischen pro- und antiangiogenen Signalen ist für die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase notwendig (15). Durch Hypoxie oder durch eine Entzündungsreaktion werden Wachstumsfaktoren wie der *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *fibroblast growth factor* (FGF) oder Angiopoetin-2 (ANG-2) freigesetzt, die die endothelialen Zellen zur Proliferation und Migration anregen. Eine verstärkte Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die die extrazelluläre Matrix degradieren, führt dazu, dass die endothelialen Zellen in das umliegende Gewebe aussprossen und eine neue Kapillare bilden (13; 14). An der Spitze der Aussprossung bildet eine endotheliale Zelle Filopodien aus und zeigt zudem ein verändertes Genexpressionsmuster im Vergleich zu den endothelialen Zellen, die den sogenannten „Stiel“ der neuen Kapillare bilden (Abb. 3). Die wachsende Kapillare kann dadurch auf spezifische Wachstumssignale der Umgebung reagieren und sich im umliegenden Gewebe in Richtung des angiogenen Stimulus ausbreiten. Die richtungsweisenden Wachstumssignale werden vor allem durch die myeloiden Zellen und Stromazellen des angrenzenden Gewebes freigesetzt (14). Die endothelialen Zellen im „Stiel“ teilen sich vermehrt und verlängern dadurch die Kapillare. Trifft die neu gebildete Kapillare auf ein angrenzendes Gefäß, fusionieren sie und der Blutstrom wird so gewährleistet (13; 14).

Die Proliferation und Aussprossung endothelialer Zellen wird vor allem durch VEGF reguliert. Durch einen angiogenen Stimulus wird VEGF von den endothelialen Zellen selbst (autokrin) und vom umliegenden Gewebe (parakrin) freigesetzt (13). VEGF vermittelt über den VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR2), auch *kinase insert domain receptor* (KDR) genannt, die Proliferation und Migration benachbarter endothelialer Zellen. Ein weiterer Rezeptor für VEGF, der VEGF-Rezeptor 1 (VEGFR1), hat im Vergleich zu KDR eine höhere

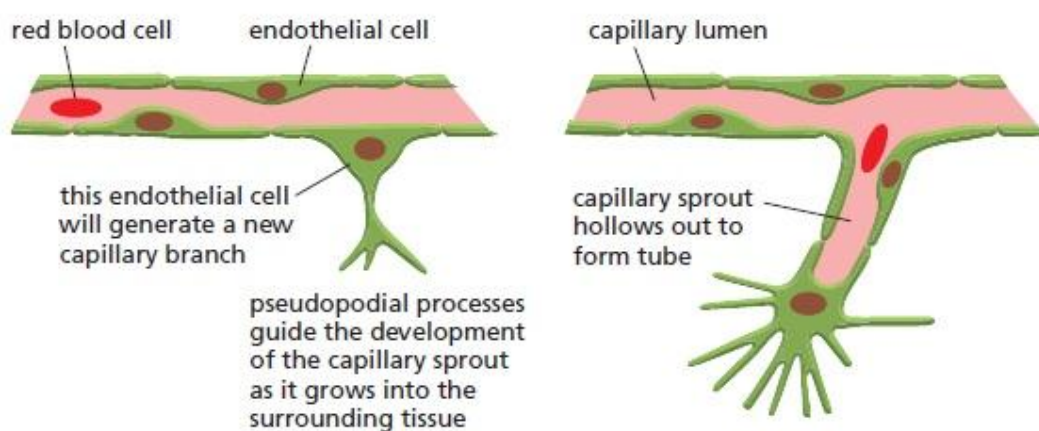


Abb. 3: Neubildung von Blutgefäßen (Angiogenese) durch endotheliale Zellen.

Ausgelöst durch Wachstumsfaktoren können endotheliale Zellen in das umliegende Gewebe aussprossen. Durch diese Aussprossung bilden sie die Grundlage für die Entstehung einer neuen Kapillare. An der Spitze der Aussprossung bilden sich Filopodien, die die Wachstumsfaktoren ihrer Umgebung wahrnehmen und sich in die entsprechende Richtung ausdehnen. Die endothelialen Zellen im „Stiel“ der neuen Kapillare proliferieren verstärkt und bewirken eine Verlängerung der entstehenden Kapillare. Quelle: Molecular Biology of the Cell (13).

Affinität für VEGF, aber eine 10-mal geringere Kinase-Aktivität (16). Durch die Bindung von VEGF an VEGFR1 wird die Menge an freiem VEGF, welches über KDR die Angiogenese induziert, reduziert. Dadurch wird das Überwachsen der Gefäße verhindert (16; 15; 17).

Die Ausbildung und Erhaltung der Blutgefäße ist essentiell für die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Gewebes, weswegen die Angiogenese auch in vielen verschiedenen Tumorentitäten eine entscheidende Rolle spielt. Ohne vaskuläre Versorgung würden die Tumorzellen nekrotisch werden und absterben. Daher ist in vielen Tumoren die Balance in Richtung der angiogenen Stimulation verschoben (18; 19). Die vaskuläre Homöostase wird gestört, wenn Tumorzellen vermehrt VEGF in das umliegende Gewebe ausschütten (parakrin) und damit angrenzende endotheliale Zellen zur Proliferation und Migration anregen (14; 17; 18). In etwa 50% aller untersuchten Tumorentitäten konnte die Expression von VEGF und dessen Rezeptoren nachgewiesen werden (18). Eine zunehmende Vaskularisierung trägt zur Tumorprogression bei und erhöht das Risiko für Metastasen, da die Tumorzellen über die Blutgefäße in andere Organe gelangen können. Die Tumorgefäße sind außerdem sehr diffus mit vielen Verzweigungen, die keinen Kontakt zu anderen Gefäßen haben, sodass kein einheitlicher Blutstrom im Tumor gewährleistet wird. Dementsprechend werden Immunzellen und Medikamente nur schlecht im Tumorgewebe verteilt, weswegen deren Effizienz reduziert wird (13; 14; 20).

1.2.3.2 Pathogenese

Angiosarkome können überall im Körper entstehen. Am häufigsten sind sie in der Haut zu finden, vorzugsweise im Kopf- und Halsbereich und etwa ein Viertel aller Angiosarkome entsteht in den Weichteilgeweben (11).

Gezielte molekulargenetische Analysen an Angiosarkomen verschiedener Primärlokalisationen wurden bereits in einigen Studien durchgeführt. Im Gegensatz zur Tumor-angetriebenen Proliferation endothelialer Zellen während der tumoreigene Angiogenese geht die verstärkte Proliferation endothelialer Zellen bei der Entstehung von Angiosarkomen von den endothelialen Zellen selbst aus (21). Da VEGF eine zentrale Rolle bei der Proliferation endothelialer Zellen spielt, wurde in verschiedenen Studien die Expression von VEGF und KDR mittels Immunhistochemie untersucht. Dabei konnte in 80% der untersuchten Angiosarkome eine erhöhte Expression von VEGF und in 94,1% der untersuchten Angiosarkome eine Überexpression von KDR gezeigt werden, wobei die Ursachen noch nicht beschrieben wurden (9; 22; 23). In einer Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Überexpression von VEGF in endothelialen Zellen, und somit die autokrine Stimulation mittels VEGF, zur Entstehung von Angiosarkomen beiträgt (21). Zudem konnten in einer weiteren Studie bei 4 von 39 untersuchten Angiosarkomen Mutationen in *KDR* identifiziert werden. Dabei handelt es

sich um zwei identische Mutationen in der Transmembrandomäne (T771R), sowie je eine Mutation in der extrazellulären Domäne (T717V) und in der Kinasedomäne (A1065T). Die T717V- und die A1056T-Mutation wurden als aktivierende Mutationen beschrieben (24). Es konnten außerdem Mutationen in *TP53* und *KRAS* identifiziert, sowie eine Überexpression von MDM2, einem negativen Regulator von p53, immunhistochemisch nachgewiesen werden (22; 25; 26). Kürzlich wurden rekurrente Mutationen in *PLCG1* und *PTPRB*, beides Gene die bei der Regulation der Angiogenese eine Rolle spielen, identifiziert (27). Durch konventionelle zytogenetische Analysen (Metaphase-Chromosomen) und *comperative genomic hybridization* (CGH) Analysen wurden 14 Angiosarkome auf chromosomale Aberrationen hin untersucht. Dabei zeigten alle Angiosarkome einen aberranten Karyotyp, wobei Zugewinne auf den q-Armen von Chromosom 8 und Chromosom 20 am häufigsten zu finden waren (28).

1.2.4 Therapie

Bei der Behandlung der Angiosarkome gibt es keine einheitliche Therapiestrategie. Die Entfernung des Tumors ist die Behandlung der ersten Wahl, in Kombination mit einer Radio- und Chemotherapie. Die meisten Angiosarkome weisen allerdings eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika auf (9; 12; 29).

Neue Therapieansätze beruhen auf der Verwendung von VEGF- und KDR-Inhibitoren. Diese Inhibitoren werden bereits für die Hemmung der tumoreigenen Angiogenese bei der Behandlung von verschiedenen Tumoren eingesetzt (30). Da Angiosarkome aus endothelialen Zellen hervorgehen und diese vor allem durch die VEGF/KDR-vermittelte Signalkaskade zur Proliferation und Migration angeregt werden, bieten diese Inhibitoren auch eine Möglichkeit zur spezifischen Behandlung von Angiosarkomen (9; 13). In einigen Studien wurde über den Einsatz des VEGF-Antikörpers Bevacizumab bei der Behandlung von Angiosarkomen berichtet. Dabei zeigten bei einer Phase II Studie (erstmalige Testung am Patienten) 2 von 23 Patienten eine partielle Remission (Abnahme des Tumolvolumens), bei 11 Patienten konnte ein stabiler und bei 10 Patienten ein fortschreitender Krankheitsverlauf beobachtet werden (31). Neben VEGF als Ansatzpunkt der Behandlung wurde auch schon der Tyrosinkinase-Inhibitor Sorafenib in mehreren Phase II Studien zur Hemmung von KDR getestet. Dabei konnte bei einer Studie mit 37 Angiosarkom-Patienten bei einem Patienten eine komplette Remission, bei 4 Patienten eine partielle Remission, bei 21 Patienten ein stabiler und bei 11 Patienten ein fortschreitender Krankheitsverlauf beobachtet werden (32). In einer Studie an Mäusen wurden zwei Angiogenese-Inhibitoren, 2-Methoxyestradiol (2ME2) und TNP-470, getestet (33). Einige Studien haben gezeigt, dass TNP-470 die Proliferation endothelialer Zellen inhibiert, indem es in den Zellzyklus eingreift. TNP-470 induziert die Expression des Cyclin-abhängigen Kinase Inhibitors p21, welcher einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase bewirkt (34; 35; 36). 2ME2

reguliert posttranskriptionell das Proteinlevel des Transkriptionsfaktors *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) und inhibiert dadurch die HIF-1 induzierte Expression von VEGF (37). In der bereits erwähnten Studie wurde den Mäusen zunächst eine Zelllinie injiziert, die zur Bildung von Angiosarkomen führt, bevor die Tiere mit der jeweiligen Substanz behandelt wurden. Dabei konnte beobachtet werden, dass TNP-470 das Tumolvolumen um 84% und 2ME2 um 68% reduziert (33). Bei einer Studie an Patienten konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass eine Kombination aus Angiogenese-Inhibitoren und Chemotherapie bei 2 von 5 Angiosarkom-Patienten zu einer kompletten Remission, bei 2 Patienten zu einem stabilen und bei einem Patienten zu einem fortschreitenden Krankheitsverlauf führt (38).

1.2.5 Primäre kardiale Angiosarkome

Primäre kardiale Tumore sind sehr selten und nur in 25% der Fälle bösartig (29). Bei 95% der malignen Tumore handelt es sich um Sarkome, die am häufigsten als Angiosarkome (37%) oder als die nicht weiter spezifizierten Sarkome (Sarkome NOS, engl.: *not otherwise specified*) (24%) identifiziert werden (12; 29).

Die kardialen Angiosarkome entstehen meist im mittleren Alter und betreffen mehr Männer als Frauen. Es handelt sich um sehr aggressive Neoplasien, da mehr als die Hälfte der Patienten Metastasen entwickeln, die vor allem die Lunge, aber auch das Gehirn, die Knochen und den Dickdarm befallen (29; 39). Die Patienten sind meist asymptomatisch, bis der Tumor eine gewisse Größe erreicht hat oder der Patient Metastasen-bedingt Symptome entwickelt. Daher ist die Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose oft bereits fortgeschritten und die Prognose mit einer durchschnittlichen Überlebensrate von 4 Monaten sehr ungünstig (12).

Die Pathogenese der kardialen Angiosarkome ist aufgrund der Seltenheit der Tumore weitgehend unbekannt. Es existieren nur wenige Studien bei denen der Mutationsstatus und die größeren chromosomalen Veränderungen an einer kleinen Anzahl kardialer Angiosarkome untersucht wurden. Dabei konnten in 2 von 4 untersuchten kardialen Angiosarkomen Mutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* und in 2 von 3 untersuchten kardialen Angiosarkomen Mutationen im Onkogen *KRAS* nachgewiesen werden (25; 40). In einer weiteren Studie konnte in 5 von 26 untersuchten kardialen Angiosarkomen eine Überexpression von MDM2 beobachtet werden (41). In einem Fallbericht wurde ein kardiales Angiosarkom mittels konventioneller zytogenetischer Analyse auf numerische Aberrationen hin untersucht. Dabei wurden vor allem chromosomale Zugewinne identifiziert, die die Chromosomen 1, 2, 7, 8, 17, 19, 20, 21 und 22 betrafen (42).

Aufgrund der Seltenheit der kardialen Angiosarkome, der weitgehend unbekannten Pathogenese und der geringen Anzahl klinischer Studien gibt es keine systematische Therapiestrategie. Eine komplette Resektion ist durch die Lage am Herzen schwierig und durch

die Anwendung einer Radiotherapie könnten zusätzliche Schäden am Herzen entstehen (29; 43). Da Angiosarkome häufig resistent gegenüber Chemotherapeutika sind, wird auch die Herztransplantation in Betracht gezogen (12; 29). Jedoch würden nur Patienten dafür in Frage kommen, die noch keine Metastasen entwickelt haben (29). Da es sich aber in der Regel um metastasierungsfähige hochmaligne Sarkome handelt und die Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits Metastasen entwickelt haben, findet die Herztransplantation wenig Anwendung bei der Therapie kardialer Angiosarkome.

1.3 Neue genomweite Analyseverfahren zum Nachweis genomischer Aberrationen

Für die Behandlung von Tumoren ist es wichtig, die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung und Entwicklung beitragen, zu verstehen und entsprechend der genetischen Veränderungen gezielte Therapien zu entwickeln. Bis zur Entwicklung genomweiter Analyseverfahren wurden bei Tumoren mit unbekannter Pathogenese nur hypothesengetriebene Untersuchungen an Genen, die in vielen Tumoren von Mutationen betroffen sind, durchgeführt. Dazu gehört bspw. die Mutationsanalyse des Tumorsuppressorgens *TP53*, welches in 50% aller untersuchten Tumorentitäten inaktivierende Mutationen aufweist (44). Neue Analyseverfahren ermöglichen seit ein paar Jahren ein genomweites *Screening* von Tumoren, sowohl in Bezug auf größere chromosomale Veränderungen, sowie kleinere Insertionen, Deletionen und Punktmutationen, als auch auf veränderte mRNA- und miRNA-Expressionsmuster. Diese Methoden beruhen auf den sogenannten Hochdurchsatzverfahren, die in kürzester Zeit genomweite Analysen ermöglichen (45).

Mittlerweile gehören die *next generation sequencing* (NGS) Technologien zur Identifizierung von Mutationen zu den Routineverfahren und beruhen auf der Parallelsequenzierung von Millionen von Sequenzen in einem einzigen Sequenzierungslauf (46). So können bspw. mit dem NextSeq500 Sequencing System von Illumina bis zu 120 Gb Sequenz innerhalb von 29 Stunden produziert werden, wodurch die Sequenzierung des gesamten Genoms in einem Lauf ermöglicht wird (47). Durch die konventionelle Sanger-Sequenzierung können in einem Lauf hingegen nur etwa 96 kb Sequenz generiert werden, was einem Daten-Unterschied um den Faktor 10^6 entspricht. In Bezug auf die Menge der generierten Sequenz stellen die NGS-Verfahren nicht nur eine zeiteffiziente sondern auch eine kostengünstige Methode für Mutationsanalysen dar (48). Mittels NGS können das gesamte Genom, das gesamte Exom oder gezielt bestimmte Gene auf Mutation hin untersucht werden (49). Die Sequenzierung des gesamten Genoms hat den Vorteil, dass neue und seltene Mutationen identifiziert werden können, die auch Promotor-Regionen oder regulatorische Bereiche betreffen (50). Da in der Tumorforschung die Sequenzierung des gesamten Genoms

nicht notwendig ist, werden meist nur die codierenden Regionen (*whole-exome sequencing*), die nur etwa 1% des gesamten Genoms ausmachen, sequenziert (49; 51). Zudem lassen sich Mutationen in codierenden Regionen meist besser interpretieren, als Mutation in nicht-codierenden Regionen. Für die Sequenzierung des gesamten Genoms, bspw. mit der NGS-Plattform von Illumina, wird die genomische DNA zunächst durch zufälliges Scheren fragmentiert, mit Adaptoren ligiert, denaturiert und über die Adapter an komplementäre Oligonukleotide auf der Oberfläche einer Durchflusskammer hybridisiert. Im Anschluss erfolgt die Vervielfältigung der Fragmente (klonale Amplifikation) gefolgt von der Sequenzierungsreaktion, bei der Millionen DNA-Fragmente parallel sequenziert werden können (52). Die Sequenzierung des Exoms beruht auf der *hybrid capture*-Methode. Dafür wird genomische DNA fragmentiert, an zum Exom komplementäre Sequenzen hybridisiert und aufgereinigt, bevor die *postcapture* Amplifikation (klonale Amplifikation) und anschließend die Sequenzierung erfolgen (53). Bei der *whole-genome* und *whole-exome* Sequenzierung empfehlen die Hersteller der NGS-Plattformen, DNA aus Frischmaterial zu verwenden, da DNA, die aus Formalin-fixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) Proben gewonnen wird, durch die Fixierung oft mit Proteinen vernetzt ist und deswegen für viele Enzyme nicht zugänglich ist. Zudem ist die DNA häufig degradiert und schlecht amplifizierbar. Es konnte allerdings schon gezeigt werden, dass die Gesamtgenom-Sequenzierung auch mit FFPE-Gewebe durchgeführt werden kann (54). Da aber oft nur wenig Tumormaterial in Form von FFPE-Gewebe zur Verfügung steht und für die *whole-genome* und *whole-exome* Sequenzierung viel Ausgangsmaterial benötigt wird, bietet sich bei diesen Proben das *targeted* NGS (tNGS) an. Beim tNGS wird wenig Ausgangsmaterial benötigt und spezielle Primer-Gemische ermöglichen zunächst die Amplifikation kurzer DNA-Fragmente (100-200 bp), die zur Detektion von Mutationen in bestimmten Genen oder Zielregionen sequenziert werden. Nach der PCR werden die Amplifikate mit Plattform-spezifischen Adaptoren ligiert, klonal amplifiziert und für die Sequenzierung eingesetzt (53). Für das tNGS bieten verschiedene Hersteller sogenannte Gen-Panels an, die eine bestimmte Auswahl an Primern enthalten. Das Comprehensive Cancer Panel der Ion Torrent Plattform (Life Technologies) beinhaltet zum Beispiel 16.000 Primerpaare, mit denen Mutationen in 409 häufig mutierten Tumorsuppressor- und Onkogenen untersucht werden können.

Durch die genomische Instabilität der Tumore entstehen neben kleineren Insertionen, Deletionen und Punktmutationen auch größere numerische Aberrationen. Dabei treten chromosomale Amplifikationen häufig im Bereich von Onkogenen auf, wohingegen Tumorsuppressorgene eher von einem Verlust des entsprechenden Chromosomenabschnitts betroffen sind (55). Für eine genomweite Analyse numerischer Aberrationen werden u. a. sogenannte *single-nucleotide polymorphism* (SNP)-Arrays verwendet. Als SNP bezeichnet man

Unterschiede einzelner Basenpaare, die mit einer Häufigkeit von mehr als 1% in einer Population auftreten. Im humanen Genom befinden sich schätzungsweise 10 Millionen SNPs (56). Eine Auswahl von mehreren tausend SNPs, die über das gesamte Genom verteilt sind und eine hohe Allelfrequenz aufweisen, werden von verschiedenen Herstellern als Marker für genomweite chromosomale Untersuchungen verwendet. Beispielsweise werden bei dem HumanOmniExpress-FFPE BeadChip von Illumina ca. 700.000 bekannte, hochkonservierte SNPs als Marker verwendet. Für die SNP-Analyse mit dem Illumina BeadChip wird die zu untersuchende genomische DNA amplifiziert, fragmentiert und an komplementäre Oligonukleotide hybridisiert, die gleichzeitig als Primer fungieren. Ausgehend von dem gebundenen DNA-Fragment wird das Oligonukleotid um genau eine Base verlängert. Diese Position entspricht dem gesuchten SNP und wird durch eine Farbreaktion markiert und detektiert. Dadurch können die bekannten SNPs den Chromosomen zugeordnet werden, die in Form eines virtuellen Karyogramms rekonstruiert werden. Wird in der zu untersuchenden Probe über einen längeren Bereich durch die Messung der Farb- und Signalintensität eine Abweichung von der Referenz detektiert, handelt es sich um eine chromosomale Aberration. Mit Hilfe der Allelfrequenz und der Signalintensität der markierten SNPs kann zwischen einem Zugewinn, Verlust oder einem Verlust der Heterozygotie ohne Veränderung der Kopienzahl (engl.: *copy neutral loss of heterozygosity*, cnLOH) des entsprechenden Chromosomenabschnitts unterschieden werden (57).

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, nicht codierende RNAs (20-24 Nukleotide), die die Expression Protein-codierender Gene auf posttranskriptioneller Ebene regulieren. Die Regulation beruht auf dem Gen-*Silencing*, indem die miRNAs an die mRNA binden und dadurch entweder die Translation hemmen oder die Degradierung der mRNA vermitteln (58; 59). Derzeit sind mehr als 1400 humane miRNAs bekannt, die für die normale Entwicklung und Differenzierung wichtig sind, aber auch Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von Tumoren haben können (58). MicroRNAs, die die Expression von Tumorsuppressorgen regulieren, könnten in Tumoren überexprimiert sein und diese Gene somit verstärkt still legen. Im Gegensatz dazu könnten miRNAs, die die Expression von Onkogenen regulieren, weniger stark ausgeprägt sein, sodass die entsprechenden Onkogene verstärkt exprimiert werden (60). Zur Untersuchung differentiell exprimierter miRNAs wurden miRNA Microarrays entwickelt. Ein Vorteil der miRNA-Analysen liegt darin, dass diese kurzen RNAs stabiler sind als mRNAs, sodass sie für eine Isolation aus dem FFPE-Gewebe gut geeignet sind und robuste Biomarker darstellen (60). So kann bspw. die Expression von 377 verschiedenen miRNAs einer FFPE-Tumorprobe mit Hilfe einer auf TaqMan-Sonden basierten *real-time* PCR in einem einzigen Lauf untersucht werden.

Mit Hilfe dieser genomweiten Analyseverfahren können durch eine offene Herangehensweise genetische Veränderungen in Tumoren identifiziert werden, deren

Pathogenese weitgehend unbekannt ist und deren Untersuchung nicht hypothesengetrieben ist. Dieses Tumor-*Screening* liefert neue Ansatzpunkte für weitere Analysen, die zur Aufklärung der pathogenen Mechanismen und zur Entwicklung neuer Therapiestrategien beitragen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Kardiale Angiosarkome sind sehr selten und mit einer schlechten Prognose verbunden. Die pathogenen Mechanismen sind weitgehend unbekannt, da molekularpathologische Untersuchungen bisher nur an wenigen Fällen durchgeführt wurden. Dabei lag das Augenmerk vor allem auf Genen, die in anderen Tumorentitäten häufig Aberrationen aufweisen. Daher bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, 10 primäre kardiale Angiosarkome durch offene, genomweite Analyseverfahren auf genetische Aberrationen zu untersuchen. Die kardialen Angiosarkome sollten dabei mit kardialen Sarkomen NOS sowie mit Angiosarkomen anderer Primärlokalisation verglichen werden. Alle Tumorproben lagen in Form von FFPE-Gewebe vor und wurden von der Herzchirurgie und Pathologie der Westfälischen-Wilhelms-Universität in Münster und von der Pathologie in Gießen zur Verfügung gestellt.

Zum einen sollten alle kardialen Sarkome mittels der Infinium HD Bead Chip Technologie von Illumina mittels *SNP-Arrays* auf größere chromosomale Zugewinne und Verluste hin analysiert werden. Zum anderen sollten die kardialen Angiosarkome mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) auf Insertionen, Deletionen und Punktmutationen hin untersucht werden. Da nur wenig Probenmaterial zur Verfügung stand und die Qualität der DNA durch die Formalin-Fixierung eingeschränkt ist, konnten keine *whole-genome* oder *whole-exome* Sequenzierungsanalysen durchgeführt werden. Daher sollten die FFPE-Tumorproben durch das *targeted* NGS (tNGS), basierend auf der Ion Torrent Halbleitersequenzierungs-Technologie, analysiert werden. Um möglichst viele Gene, die bei der Pathogenese von Tumoren eine Rolle spielen könnten, auf Mutationen zu untersuchen, sollte das Comprehensive Cancer Panel von Ion Torrent verwendet werden, welches 409 häufig mutierte Tumorsuppressor- und Onkogene abdeckt und das derzeit umfangreichste Gen-Panel für das tNGS darstellt. Neben der Analyse auf DNA-Ebene sollten außerdem differentiell exprimierte miRNAs durch genomweite Expressionsanalysen mit Hilfe der TaqMan Low Density Arrays untersucht werden.

Im Anschluss an die verschiedenen genomweiten Analyseverfahren sollten funktionelle Versuche mit Genen deregulierter Expression und/oder mit mutierten Genen an Zelllinien durchgeführt werden.

2. Material

2.1 Patientenproben

Die primären kardialen Angiosarkome (n=10) sowie die nicht weiter spezifizierten kardialen Sarkome (Sarkome NOS, engl.: *not otherwise specified*) (n=6) und ein kardiales Rhabdomyosarkom wurden von 2002 bis 2013 durch die Herzchirurgie und Pathologie der Westfälischen-Wilhelms-Universität in Münster gesammelt. Angiosarkome anderer Lokalisation (n=7, aus Lunge oder Leber) wurden ebenfalls von der Pathologie der Westfälischen-Wilhelms-Universität in Münster sowie von der Pathologie des Universitätsklinikums Gießen zur Verfügung gestellt. Diese Proben wurden zur Langzeitaufbewahrung in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Für die *next generation sequencing* (NGS) Analysen mit den kardialen Angiosarkomen wurde neben dem Tumorgewebe auch das tumorfreie Gewebe als Referenz benötigt. Dieses konnte nur aus 6 Patientenproben durch Makrodissektion gewonnen werden.

2.2 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller, Firmensitz
ABI prism RealTime-PCR System	7900 HAT	Life Technologies, Carlsbad (CA)
ABI Genetic Analyzer	3730xl	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Array scanner	iScan	Illumina, San Diego (CA)
Autoklav	2540EL	Tuttnauer, Breda (Niederlande)
Bioanalyzer	2100	Agilent Technologies, Santa Clara (CA)
Blotkammer	Mini-Protean Tetra System	Biorad, Hercules (CA)
Brutschrank	HERACell 150i CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Waltham (MA)
Durchflusszytometer	guava easyCyte HT	Merck Millipore, Billerica (MA)
Fluorometer	Qubit	Life Technologies, Carlsbad (CA)
	Qubit 2.0	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Gelkammer	Xcell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Hybridisierungssofen	Illumina Hybridization Oven	Illumina, San Diego (CA)

Inkubator	KS 4000 ic control	IKA, Staufen
Ion Torrent System	Ion OneTouch	Life Technologies, Carlsbad (CA)
	Ion OneTouch ES	Life Technologies, Carlsbad (CA)
	Ion PGM System	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Lichtmikroskop	Leica DM IL	Leica, Wetzlar
Magnet	Invitrogen DynaMag-2	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Magnetrührer	IKA RCT	IKA, Staufen
Maxwell System	Maxwell 16	Promega, Madison (WI)
Mikrotom	SM2000R	Leica, Wetzlar
Pipetten	0,5-10/10-100/100-1000 µl	Biohit, Helsinki (Finnland)
Präzisionswaage	PM480 Delta Range	Mettler-Toledo, Greifensee
Rainin Pipet-Lite LTS	L-20, L-100	Mettler Toledo, Greifensee
Real-Time PCR System	Step One	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Reinstwassersystem	Direct-Q 3	Merck Millipore, Billerica (MA)
Rollmischer	CAT RM 5	neoLab, Heidelberg
Schüttler	Swip KL-2	Edmund Bühler, Hechingen
	MS2 basic	IKA, Staufen
Sonifizierer	Digital Sonifier 250	Branson, Dietzenbach
Spektrophotometer	Nanodrop	Thermo Scientific, Waltham (MA)
Sterilbank	MSC-Advantage Class II Biological Safety Cabinets	Thermo Scientific, Waltham (MA)
Stromgeneratoren	EV231, E853	Consort, Turnhout (Belgien)
Thermoblock	Thermomixer comfort (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
	Hybex Microsample Incubator	SciGene, Sunnyvale (CA)
Thermozykler	Veriti 96-Well Fast Thermal	Life Technologies, Carlsbad (CA)
	Cycler	
Vortexer	VF2	IKA, Staufen
Wasserbad	Schüttelwasserbad WB22	Memmert, Schwabach
Zählkammer	Neubauer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf
Zentrifugen	5417R	Eppendorf, Hamburg
	5415R	Eppendorf, Hamburg
	Rotanta/ TRC	Hettich, Tuttlingen
	Heraeus Biofuge 15R	Thermo Scientific, Waltham (MA)
	Heraeus Biofuge pico	Thermo Scientific, Waltham (MA)

MiniStar silverline

VWR, Radnor (PA)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller, Firmensitz
6-, 12-, 24-, 96-Well Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
24-Well Companion Zellkulturplatte	BD Bioscience, Heidelberg
96-Well, 0,8 ml microtiter plate (MIDI)	Thermo Scientific, Waltham (MA)
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (GB)
BioCoat Control Zellkultureinsätze (24-Well Platten, 8 µm Poren)	BD Bioscience, Heidelberg
BioCoat Matrigel Invasionseinsätze (24-Well Platten, 8 µm Poren)	BD Bioscience, Heidelberg
Deckgläschen (24 x 26 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen
DNA LoBind Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Einweg-Skalpell	pfm medical ag, Köln
Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Immobilon Blotting Filter Papier	Merck Millipore, Billerica (MA)
Immobilon PVDF-Membran	Merck Millipore, Billerica (MA)
Kanülen (1,2 x 40 mm)	BD Bioscience, Heidelberg
MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad (CA)
MicroAmp PCR-Röhrchen (0,1 ml, 0,2 ml)	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Nunc Kryo-Röhrchen	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gele (1,0 mm; 10-, 12-, 15-, 17-Well)	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Objektträger, Super Frost	R. Langenbrinck, Emmendingen
Qubit Assay Tubes	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Petrischale, 94 x 16 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen
Rainin SR-L10F pipette tips	Mettler Toledo, Greifensee
Rainin SR-L200F pipette tips	Mettler Toledo, Greifensee
SafeSeal Tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Sealing mat (round cap)	Thermo Scientific, Waltham (MA)
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Wägeschalen	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner bio-one, Frickenhausen

2.4 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

Substanz	Hersteller, Firmensitz
AccuPrime Pfx DNA Polymerase	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Agencourt AMPure XP Reagent	Beckman Coulter, Brea (CA)
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare, Chalfont St. Giles (GB)
Ampicillin	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Aq. dest. (Aqua ad injectabilia)	B Braun, Melsungen
Borsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
Corbit Balsam	Hecht, Kiel-Hassee
Dako Antibody Diluent	Dako, Glostrup (Dänemark)
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
DynaBeads MyOne Streptavidin C1	Life Technologies, Carlsbad (CA)
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol (absolut)	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
ExoSAP-IT	Affymetrix, Santa Clara (CA)
Formamid	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
GeneRuler 1kb plus DNA Marker	Thermo Scientific, Waltham (MA)
GeneRuler Low Range DNA Marker	Thermo Scientific, Waltham (MA)
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Hämatoxylin	Dako, Glostrup (Dänemark)
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
KODAK READYMATIC Entwickler	Kodak, Rochester (NY)
KODAK READYMATIC Fixierer	Kodak, Rochester (NY)
LB Agar	Life Technologies, Carlsbad (CA)
LB Broth	Life Technologies, Carlsbad (CA)
MagicMarker XP Western Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Megaplex RT Primer Pool A v2.1, Human	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Mineralöl	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)

Natriumcitrat (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
Neomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
Nuklease-freies Wasser	Life Technologies, Carlsbad (CA)
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies, Carlsbad (CA)
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20X)	Life Technologies, Carlsbad (CA)
NuSieve 3:1 Agarose	Lonza, Basel (Schweiz)
Propidiumiodid (PI)/Rnase Staining Buffer	Merck Millipore, Billerica (MA)
Restriction Enzyme Reaction Buffer D (10x)	Promega, Madison (WI)
SOC Medium	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Sodium Orthovanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
Spectra Multicolor Broad Range Protein Marker	Thermo Scientific, Waltham (MA)
TaqMan Universal PCR Mastermix (2x), no AmpErase UNG	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe
Tris HCl	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
XhoI	Promega, Madison (WI)
Xylol	Sigma-Aldrich, St. Louis (MO)
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.5 Zellkultur-Medien und -Reagenzien

Substanzen	Hersteller/Firmensitz
1x Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	PromoCell, Heidelberg
Endothelial Cell Growth Medium 2 (ECGM2)	PromoCell, Heidelberg
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies, Carlsbad (CA)
FuGene HD Transfection Reagent	Promega, Madison (WI)
Penicillin/Streptavidin (P/S)	Life Technologies, Carlsbad (CA)
PromoFectin-HUVEC	PromoKine, Heidelberg
Recovery-Cell Culture Freezing Medium	Life Technologies, Carlsbad (CA)
RPMI Medium 1640	Life Technologies, Carlsbad (CA)

2.6 Lösungen und Puffer

Agarose (1-2% w/v)	0,5-1 g NuSieve 3:1 Agarose ad 50 ml TBE (0,5x)
Block-Puffer (5% w/v)	2,5 g BSA/Milchpulver ad 50 ml TBST
Citratpuffer	Stammlösung A: 0,1M Zitronensäure aq. dest. Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitrat aq. dest. Citratpuffer: 1,8 ml Stammlösung A + 8,2 ml Stammlösung B + 90 ml aq. dest.
Glycerol (50% v/v)	10 ml Glycerol (100%) + 10 ml aq. dest.
LB Agar	6,4 g LB Agar ad 200 ml aq. dest.
LB Medium	5 g LB Broth ad 250 ml aq. dest.
MOPS-Puffer (1x)	50 ml NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (20X) + 950 ml aq. dest.
Pervanadat (30mM)	30mM Orthovanadat 0,18% H ₂ O ₂ 1x PBS
Sample Buffer (2x)	5 ml NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) + 1ml DTT (1M) + 4 ml aq. dest.
TBE (5x)	54,5 g Tris Base + 27,8 g Borsäure + 2,9 g EDTA ad 1000 ml aq. dest.

TBS (20x)	18 g Tris Base + 137 g HCl + 175,6 g NaCl ad 1000 ml aq. dest.
TBST (1x)	50 ml TBS (20x) + 1 ml Tween 20 + 949 ml aq. dest.
Towbin-Puffer (10x)	30,29 g Tris Base + 144 g Glycin + 250 mg SDS ad 1000 ml aq. dest.

2.7 Verwendete Kits

Kit	Hersteller, Firmensitz
Alexa Fluor 488 Annexin V/ Dead Cell Apoptosis Kit	Life Technologies, Carlsbad (CA)
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Dako REAL Detection System AP/RED Rabbit/Mouse	Dako, Glostrup (Dänemark)
Detach Kit	PromoCell, Heidelberg
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Venlo (Niederlande)
Fast SYBR Green Master Mix	Life Technologies, Carlsbad (CA)
GeneAmp Fast PCR Master Mix (2x)	Life Technologies, Carlsbad (CA)
GENEART Site-Directed Mutagenesis System	Life Technologies, Carlsbad (CA)
High Sensitivity DNA Analysis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara (CA)
HumanOmniExpress-FFPE BeadChip Kit	Illumina, San Diego (CA)
Infinium HD FFPE Assay	Illumina, San Diego (CA)
Infinium HD FFPE DNA Restore Kit	Illumina, San Diego (CA)
Infinium HD FFPE QC Kit	Illumina, San Diego (CA)
Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Ion AmpliSeq Library Kit 2.0	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Ion OneTouch 200 Template Kit v2	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Ion PGM 200 Sequencing Kit	Life Technologies, Carlsbad (CA)
Ion Sphere Quality Control Kit	Life Technologies, Carlsbad (CA)
IP-One ELISA Assay	Cisbio, Codolet (Frankreich)
Maxwell 16 FFPE Tissue LEV DNA Purification Kit	Promega, Madison (WI)
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad (CA)

Qubit dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad (CA)
TaqMan Human MicroRNA Array A 2.0	Life Technologies, Carlsbad (CA)
TaqMan Micro RNA Assay (RNU48)	Life Technologies, Carlsbad (CA)
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies, Carlsbad (CA)
ZR-96 DNA Clean & Concentrator-5	Zymo Research, Irvine (CA)

2.8 Primer

Verwendung	Primer	Primer Sequenz (5' → 3')
PCR und konventionelle Sequenzierung	ASXL1-Ex11-US	CTGAAATCAAAAGTGGCTTGTGTGTCC
	ASXL1-Ex11-LS	CATCCTTGTAGAGGGGAACATCTGAGG
(Mutations- Verifizierung)	DCC-Ex24-US	CAAAAGGAAGGGCAGCCAGAAGG
	DCC-Ex24-LS	CCTGAATGAGAGGTGCTTTTGCTTCC
	ERBB4-Ex17-US	CTCTTCCTTCTAACATAAACAGCAAATGTCAGACC
	ERBB4-Ex17-LS	AACTGCTCTTTTCTCTTCCTCTGTCTTCTCTCTC
	FGFR1-Ex12-US	GACTGATACCCCAGCTCAGATCTTCTCC
	FGFR1-Ex12-LS	GACGCAACAGAGAAAGACTTGTGTCAGACC
	KDR-Ex15-US	CCACTGACCTTCTATTATGAAAAATGCCTCC
	KDR-Ex15-LS	GATGAAGGGCAGCATTTATATTTTCTAAATTTCC
	KDR-Ex16-US	CATTAATCATGAAAACCAATGTGCATGG
	KDR-Ex16-LS	CTGTTGTCCTCTAGGATTTTCCAAGTTGG
	LRP1B-Ex27-US	ACAATGTGTTGGTCCTCCAGTCTGTCC
	LRP1B-Ex27-LS	ATTTATCTTTCTGTAGGTCAGATGCTATTTATTTCAG CC
	MLL2-Ex19-US	CAGCTCATCGGTGTCCAGGTCC
	MLL2-Ex19-LS	GGATCACATACTCTTTCCTCTTATGCAGAGC
	MLL2-Ex48-US	GGAAGTTCAACCAAGGGCTCAGTAGG
	MLL2-Ex48-LS	CCCTGCACCTGAGGAGCTGC
	MLL2-Ex52-US	CCAGAGTGCCACTCTCAGGGACC
	MLL2-Ex52-LS	CTGAGTCTCCTACCTGATCCCACAGC
	NRAS-Ex3-US	ACAGAAAACAAGTGGTTATAGATGGTGAAACC
	NRAS-Ex3-LS	AGAGGTTAATATCCGCAAATGACTTGC
	PLCG1-Ex18-US	GCGCGTCCCTCGTGATGG
	PLCG1-Ex18-LS	GGACAAAACAGTCACACAGGGTCAGG
	POT1-Ex14-US	CAAAAGGAGTATTCTAACAAAACAGTGACTTAAA TATCTTACC

	POT1-EX14-LS	CGATTTGGATATAATTTTTCAGGATGGTGC
	RAF1-Ex7-US	CACCCCATTAATTGACTGACATTACCACC
	RAF1-Ex7-LS	ATGGAATTTTCTTTCTCCTCCTAGTTCTCAGC
PCR und konventionelle Sequenzierung (Insert)	PLCG1-US1	GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG
	PLCG1-LS1	CATCAGCCAAGTTAAGCCCTTGATCC
	PLCG1-US2	AGCCTGCAAGCCACATCTGAGG
	PLCG1-LS2	GGAGAACAGGAAGGTGACAACTCATCC
	PLCG1-US3	CGAGAGATCGAGGAGCCATACTTCTTCC
	PLCG1-LS3	GCCCTCAGCCAGCTTCTTGTGC
	PLCG1-US4	CACCCAACCAGCTTAAGAGGAAGATCC
	PLCG1-LS4	ACCTGCTGGTAGTGCGTGATGAGG
	PLCG1-US5	TTGACAGACAACCTCGTCTTTGACTCC
	PLCG1-LS5	GCTTTGACTGCACACTTGAAAGTTGG
	PLCG1-US6	ACGCAACCCTGGCTTCTATGTAGAGG
	PLCG1-LS6	CGGCAGTAGACGACAAGTTCAGAGAGC
	PLCG1-US7	ACGGAGGAAGAAGATTGCCCTGG
	PLCG1-LS7	TGCTTGGTGCTGTCATACTCAGCTCC
	PLCG1-US8	GTGTCCTTTTGTGGAGATTGAGGTGG
	PLCG1-LS8	CCATTGACCCGAGTCCTTCTTGG
	PLCG1-US9	GCAGACCATTTTGACAGTCGAGAACG
	PLCG1-LS9	GCCTGGTCATGCATGCCTGG
Mutagenese (c.2120G>A, p.R707Q)	PLCG1-3148-FW	ATGCCATCTCTTTCCAGGCTGAGGGCAAGAT
	PLCG1-3148-RV	ATCTTGCCCTCAGCCTGGAAAGAGATGGCAT
Mutagenese (fehlerhafte Position)	PLCG1-2856-FW	GTCCAGCACTGCCGTATCCACTCCCGGCAAG
	PLCG1-2856-RV	CTTGCCGGGAGTGGATACGGCAGTGCTGGAC
Mutagenese (fehlerhafte Position)	PLCG1-3466-FW	ACGAGCTGACCTTCATCAAGAGCGCCATCAT
	PLCG1-3466-RV	ATGATGGCGCTCTTGATGAAGGTCAGCTCGT

2.9 Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller Firmensitz	Referenz	An- wendung
CD117 (KIT)	Kaninchen pAb		Dako Glostrup, Denmark	A4502	IHC
Cofilin	Kaninchen mAb	1:1.000	Cell Signaling Danvers, MA	3312	WB
cRAF	Kaninchen pAb	1:5.000	Cell Signaling	9422	WB
GAPDH	Maus mAb	1:1.000.000	Santa Cruz Santa Cruz, CA	sc-32233	WB
Goat Anti-Mouse Immunglobulin/HRP	Ziege pAb	1:5.000	Dako	P0260	WB
Goat Anti-Rabbit Immunglobulin/HRP	Ziege pAb	1:5.000	Dako	P0448	WB
MEK1	Maus mAb	1:10.000	Cell Signaling	2352	WB
NFAT	Kaninchen mAb	1:2.000	Cell Signaling	5861	WB
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Kaninchen mAb	1:5.000	Cell Signaling	4695	WB
Phospho-Cofilin (S3)	Kaninchen pAb	1:1.000	Cell Signaling	3311	WB
Phospho-cRAF (S338)	Kaninchen mAb	1:2.000	Cell Signaling	9427	WB
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (T202/Y204)	Kaninchen mAb	1:2.000	Cell Signaling	4370	WB
Phospho-PLCG1 (Y783)	Kaninchen pAb	1:2.000	Cell Signaling	2821	WB
Phospho-MEK1/2 (S217/221)	Kaninchen mAb	1:2.000	Cell Signaling	9154	WB
PLCG1	Kaninchen mAb	1:20.000 (WB) 1:100 (IHC)	Cell Signaling	5690	WB, IHC
p-NFATc2 (S326)	Kaninchen pAb	1:1.000	Santa Cruz	sc-32994	WB
VEGFR2	Kaninchen	1:800	Cell Signaling	9698	IHC

mAb

WB: Western Blot; IHC: Immunhistochemie; HRP: *horseradish peroxidase*; mAb: *monoclonal antibody*; pAb: *polyclonal antibody*

3. Methoden

3.1 DNA- und RNA-Isolation aus den Patientenproben

3.1.1 DNA-Isolation

Die Isolation der DNA erfolgte teilautomatisiert mit dem Maxwell 16 System und dem FFPE LEV DNA Purification Kit. Da die Patientenproben in Form von Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem (FFPE) Gewebe vorlagen, wurden mit dem Mikrotom zunächst 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Je nach Tumoranteil wurde der gesamte Schnitt für die DNA-Isolation verwendet oder der entsprechende Tumorbereich durch Makrodissektion gewonnen. Gleiches galt für die DNA-Isolation aus tumorfreien Bereichen der Patientenproben. Abhängig von der Größe des Materials wurden 2-10 Schnitte für die Isolation verwendet. Das Probenmaterial wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 180 µl Inkubationspuffer sowie 20 µl (20 mg/ml) Proteinase K Lösung überschichtet. Es folgte eine Inkubation bei 70°C über Nacht, bevor 400 µl Lyse Puffer hinzugegeben wurden. Der Ansatz wurde durch kurzes Vortexen gemischt und für die automatisierte Extraktion in die erste Kammer der Maxwell Kartusche überführt. Ein Elutions-Reaktionsgefäß mit 50 µl Elutionspuffer wurde in die dafür vorgesehene Position gesetzt, bevor das entsprechende Programm (DNA, FFPE) ausgewählt und der Lauf gestartet wurde. Die DNA-Konzentration wurde anschließend mittels Nanodrop- oder Qubit-Messung ermittelt.

3.1.2 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgte ebenfalls aus dem FFPE-Gewebe, wofür das RNeasy FFPE Kit verwendet wurde. Zunächst wurden 3 µm dicke Schnitte mit dem Mikrotom angefertigt und möglichst viel Paraffin entfernt. Abhängig von der Größe des Biopsats wurden 2-10 Schnitte in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 320 µl Deparaffinierungs-Lösung überschichtet. Der Ansatz wurde für 10 Sek. durch Vortexen gemischt und kurz an zentrifugiert. Es folgte eine Inkubation im Schüttel-Thermoblock für 3 Min. bei 56°C und 300 rpm. Nachdem die Probe auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 240 µl des PKD-Puffers hinzugegeben. Der Ansatz wurde durch kurzes Vortexen gemischt und für 1 Min. bei 10.000 rpm abzentrifugiert. Nach der Zugabe von 10 µl der Proteinase K-Lösung in die untere Phase folgte eine Inkubation im Schüttel-Thermoblock bei 56°C und 300 rpm für 30 Min. Im Anschluss wurde die Probe für 15 Min. bei 80°C inkubiert, wodurch angestrebt wurde, die durch Formalin verursachte Vernetzung der RNA zum Teil rückgängig zu machen. Die klare Flüssigkeit der unteren Phase

wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 3 Min. auf Eis gekühlt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 13.500 rpm für 15 Min., bevor der Überstand in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt wurde. Durch Zugabe des 0,1-fachen Volumens des DNase Booster Puffers sowie 10 µl DNase I erfolgte der Verdau der DNA für 15 Min. bei Raumtemperatur. Zum Lysat wurden anschließend 500 µl RBC-Puffer und 1750 µl Ethanol hinzugegeben. Im Anschluss wurden 700 µl des Ansatzes auf eine RNeasy MiniElute spin column gegeben und für 15 Sek. bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dies wurde solange wiederholt, bis der gesamte Ansatz auf die Säule übertragen worden war. Im Anschluss wurde die Säule durch Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und nochmaligem abzentrifugieren gewaschen. Das Eluieren der RNA erfolgte mit 30 µl RNase-freiem Wasser. Die Konzentration der isolierten RNA wurde anschließend mittels Nanodrop-Messung bestimmt.

3.1.3 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA mittels Nanodrop basiert auf der Absorption von UV-Licht durch die Nukleinsäuren. Die Messung wurde mit 1 µl der gelösten DNA bzw. RNA durchgeführt und erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

Für die Konzentrationsbestimmung der DNA mit Hilfe der Qubit-Messung wurde die DNA mit einem fluoreszierenden Farbstoff inkubiert, welcher in die DNA interkaliert. Hierfür standen das Qubit dsDNA HS Assay Kit (10 pg/µl - 100 ng/µl) und Qubit dsDNA BR Assay Kit (0,1 ng/µl - 1000 ng/µl) zur Verfügung. Die Messung wurde mit 1 µl DNA durchgeführt und erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

3.2 SNP-Array Analysen

Zur genomweiten Analyse von großen numerischen Aberrationen sowie von Verlusten der Heterozygotie ohne Veränderung der Kopienzahl (engl.: *copy neutral loss of heterozygosity*, cnLOH) wurden die kardialen Angiosarkome und die Sarkome NOS mittels *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Arrays untersucht. Für diese Analyse wurde die Illumina HumanOmniExpress-FFPE BeadChip Technologie verwendet, bei der ca. 700.000 bekannte, hochkonservierte SNPs als Marker dienen. Diese SNPs sind über das gesamte Genom verteilt und decken 97% der Gene ab, die in Tumoren häufig Aberrationen aufweisen.

Der Illumina BeadChip besteht aus Mikrowells in denen je ein *silica bead* gebunden ist, welches wiederum mit vielen Kopien eines spezifischen Oligonukleotids bedeckt ist. Die Verteilung der *beads* auf dem Chip erfolgt zufällig, jedoch können die verschiedenen Oligonukleotide bei der Auswertung mit dem Illumina iScan System durch eine

Erkennungssequenz unterschieden werden. Für den *Array* werden DNA-Fragmente durch Hybridisierung an komplementäre Oligonukleotide gebunden, welche wiederum als Primer fungieren. Ausgehend von dem gebundenen DNA-Fragment wird das Oligonukleotid um genau eine Base verlängert. Diese Position entspricht dem gesuchten SNP und wird entsprechend der eingebauten Base gefärbt (rot für A und T, grün für G und C). Dadurch wird eine Unterscheidung zwischen einem AT- und GC-SNP ermöglicht (Abb. 4). Die Farb- und Signalintensität wurde mit Hilfe des Illumina iScan Systems ermittelt. Durch die Färbung und Detektion der bekannten SNPs können diese mit Hilfe der Illumina GenomeStudio Software den Chromosomen zugeordnet werden, die in Form eines virtuellen Karyogramms rekonstruiert und auf Aberrationen untersucht werden.

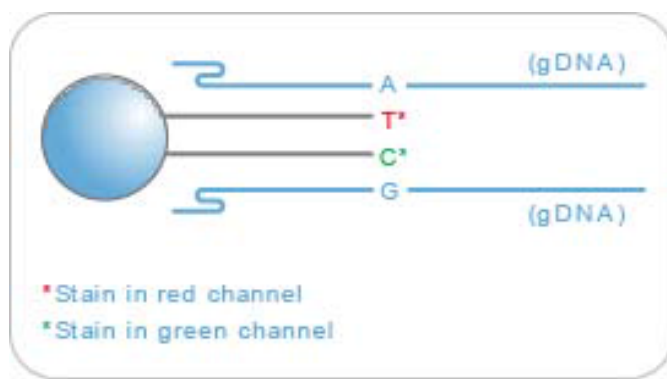


Abb. 4: Einzel-Basen Verlängerung zur Detektion der SNPs.

Quelle: Illumina, Infinium HD FFPE Manual Protocol.

3.2.1 Qualitätskontrolle der DNA-Proben

Die DNA wurde wie bereits beschrieben aus dem FFPE-Gewebe der kardialen Sarkome isoliert (siehe 3.1.1). Für den *Array* wird die gesamte genomische DNA mittels Zufallsprimer amplifiziert, wodurch genügend Ausgangsmaterial hergestellt wird. Da die DNA aber durch die Formalin-Fixierung häufig degradiert ist, entstehen bei der Amplifikation meist nur kurze Fragmente, weswegen mittels Infinium HD FFPE QC Kit zunächst die Qualität der DNA untersucht wurde. Dabei wurde eine *real-time* PCR mit SYBR Green und einem im Kit enthaltenen *Primer Reagent* (keine genauen Angaben vom Hersteller) durchgeführt. Das als Kontrolle dienende *Template Reagent* (QCT) wurde zunächst 1 zu 100 in aq. dest. verdünnt, bevor je 2 µl in 3 Wells einer 48-Well qPCR-Platte pipettiert wurden. Die zu untersuchende DNA-Probe wurde auf 1 ng/µl verdünnt, bevor ebenfalls je 2 µl in 3 Wells der qPCR-Platte pipettiert wurden. Als Negativkontrolle wurden 3 Wells mit je 2 µl aq. dest. befüllt. Der PCR-Ansatz wurde wie folgt angesetzt:

2x SYBR Master Mix	5 µl
Primer Reagent (QCP)	1 µl
Aq. dest.	2 µl

Der SYBR Green PCR-Ansatz wurde anschließend in jedes vorbereitete Well pipettiert und die PCR nach folgendem Programm im StepOne Real-Time PCR System durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 Min.	-
Denaturierung	95°C	30 Sek.	40
Annealing	57°C	30 Sek.	
Elongation	72°C	30 Sek.	

Für die Normalisierung der gemittelten Proben-Ct-Werte (Triplikate) wurde der gemittelte Ct-Wert des *Template Reagents* verwendet und der Delta-Ct-Wert ($Ct_{FFPE} - Ct_{QCT}$) errechnet. Zuvor wurden der *Threshold* und die *Baseline* für alle Proben gleich gesetzt. Proben mit einem Delta-Ct-Wert unter 5 konnten laut Herstellerangaben für die anschließende DNA-Rekonstitution verwendet werden.

3.2.2 DNA-Rekonstitution

Da die DNA durch die Formalin-Fixierung degradiert und somit fragmentiert wird, können nur kurze DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Für den SNP-Array werden zur Anreicherung des Ausgangsmaterials allerdings Zufallsprimer verwendet, die die Amplifikation der gesamten genomischen DNA ermöglichen sollen. Durch die Fragmentierung können diese Primer vermutlich nur schlecht binden und die Polymerase kann nicht lückenlos arbeiten, wodurch die Ausbeute sehr gering wäre. Um dies zu vermeiden, werden die DNA-Fragmente mit Hilfe des Infinium DNA Restoration Kit zunächst zufällig miteinander ligiert, sodass lange Fragmente entstehen und eine effiziente Polymerase Reaktion ermöglicht wird.

Für die Rekonstitution der DNA wurde die DNA-Probe auf 25 ng/µl verdünnt und 4 µl in ein Well einer 96-Well (0,8 ml) Mikrotiter Platte (MIDI) pipettiert. Es wurden anschließend 34 µl des *Primer Pre Restore Reagent* (PPR) und 38 µl *Amp Mix Restore Reagent* (AMR) zur Probe gegeben. Die Platte wurde mit einer hitzebeständigen Folie verschlossen, 10 mal invertiert und für 1 Min. bei 280 g an zentrifugiert, bevor sie im Heizblock für 1 Std. bei 37°C inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde die Platte für 1 Min. bei 280 g zentrifugiert. Die Probe wurde im Anschluss mittels ZR-96 DNA Clean & Concentrator-5 entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend durch Zugabe von 13 µl *Elution Restore Buffer Reagent* (ERB) in eine neue MIDI Platte eluiert. Diese Platte wurde anschließend mit

einer adhäsiven Folie beklebt, für 2 Min. bei 95°C im Heizblock inkubiert und danach für 5 Min. auf Eis gekühlt, bevor 10 µl des *Convert Master Mix* (CMM) hinzugegeben wurden. Die Platte wurde verschlossen und für 1 Min. im Schüttler bei 1.600 rpm gemischt. Es folgte eine Inkubation für 1 Std. bei 37°C, bevor sich erneut eine Aufreinigung mit dem ZR-96 DNA Clean & Concentrator-5 anschloss. Die DNA wurde in eine neue MIDI Platte eluiert, indem 10 µl aq. dest. auf die Aufreinigungsplatte gegeben wurden und diese entsprechend der Angaben des Herstellers abzentrifugiert wurde. Die eluierte Probe wurde in der MIDI Platte bei -20°C gelagert.

3.2.3 Denaturierung und Amplifikation der rekonstituierten DNA

Zunächst wurden 20 µl des *Multi-Sample Amplification 1 Mix* (MA1) sowie 4 µl 0,1 M NaOH zur Probe in die MIDI Platte gegeben. Die Platte wurde verschlossen und für 1 Min. bei 1.600 rpm im Schüttler gemischt und kurz bei 280 g anzentrifugiert, bevor eine Inkubation für 10 Min. bei Raumtemperatur folgte. Im Anschluss wurden 68 µl des *Random Primer Mix* (RPM) und 75 µl des *Multi-Sample Amplification Master Mix* zur Probe hinzugegeben, bei 1.600 rpm für 1 Min. im Schüttler gemischt und bei 280 g anzentrifugiert. Die Platte wurde anschließend für 20-24 Std. bei 37°C im Illumina Hybridisierungssofen inkubiert, wodurch eine gleichmäßige Amplifikation der gesamten genomischen DNA durch Zufallsprimer erfolgte.

3.2.4 Fragmentierung und Denaturierung der amplifizierten DNA

Durch einen kontrollierten enzymatischen Prozess (keine genauen Angaben vom Hersteller) wurde die amplifizierte DNA in gleichmäßig lange Abschnitte fragmentiert. Dafür wurden 50 µl der *Fragmentation Solution* (FMS) zu der Probe in die MIDI Platte gegeben. Die Platte wurde verschlossen, für 1 Min. bei 1.600 rpm im Schüttler gemischt und bei 280 g kurz anzentrifugiert, bevor eine Inkubation für 1 Std. bei 37°C folgte.

Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente gefällt, indem zunächst 100 µl der *Precipitation Solution* (PM1) zur Probe gegeben wurden. Die Platte wurde verschlossen, für 1 Min. bei 1.600 rpm im Schüttler gemischt und für 5 Min. bei 37°C inkubiert, bevor die Platte bei 280 g kurz anzentrifugiert wurde. Anschließend wurden 300 µl Isopropanol hinzugegeben. Die Platte wurde verschlossen und 10-mal invertiert, bevor eine Inkubation für 30 Min. bei 4°C folgte. Nach der Fällung der DNA wurde die Platte für 20 Min. bei 4°C und 3.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet für 1 Std. bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.5 Hybridisierung der fragmentierten DNA auf den BeadChip

Zunächst wurden die gefällten DNA-Fragmente in der *Resuspension, Hybridization and Wash Solution* (RA1) resuspendiert. Dafür wurden 30 µl RA1 hinzugegeben und die Platte mit einer Folie versiegelt, indem diese durch einen *heat sealing* Block für 3 Sek. auf der Platte befestigt wurde. Die Platte wurde im Illumina Hybridisierungssofen für 1 Std. bei 48°C inkubiert, anschließend im Schüttler bei 1.800 rpm für 1 Min. gemischt und bei 280 g kurz anzentrifugiert.

Vor der Hybridisierung wurde die resuspendierte Probe in der MIDI Platte für 20 Min. bei 95°C denaturiert. Währenddessen wurden der HumanOmniExpress-FFPE BeadChip und die Hybridisierungskammer entsprechend der Angaben des Hersteller vorbereitet, bevor 15 µl der DNA-Probe nach der Inkubation auf den Chip pipettiert wurden. Pro Chip konnten 12 DNA-Proben aufgetragen werden. Der BeadChip wurde anschließend in die vorbereitete Hybridisierungskammer eingesetzt, welche verschlossen und für 16-24 Std. bei 48°C im Illumina Hybridisierungssofen inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde der BeadChip entsprechend der Herstellerangaben gewaschen und in eine vom Hersteller empfohlene Durchflussskammer eingesetzt.

3.2.6 Einzel-Basen Verlängerung und Färbung des BeadChips

Die Einzel-Basen Verlängerung erfolgte bei 44°C in einem Wasserbad, worin sich ein Gestell für die Durchflussskammer befand. Zunächst wurde die nicht-hybridisierte DNA durch einen Waschschrift mit 150 µl RA1 entfernt. Entsprechend der Angaben des Herstellers wurden die verschiedenen Lösungen für die Einzel-Basen Verlängerung in die Durchflussskammer pipettiert, u.a. ein *Two-Color Extension Master Mix* (TEM). Dadurch kam es zur Einzel-Basen Verlängerung mit Nukleotiden, die an Biotin oder Dinitrophenyl gekoppelt sind (C und G mit Biotin gekoppelt; A und T mit Dinitrophenyl gekoppelt). Durch Zugabe von 95% Formamid/1 mM EDTA wurde die hybridisierte DNA entfernt und nach der Zugabe einer Neutralisierungs-Lösung wurde die Färbung der eingebauten Nukleotide durch einen mehrstufigen Färbeprozess entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Detektion der gefärbten Nukleotide erfolgte mit Hilfe des iScan Systems.

3.2.7 Auswertung der SNP-Array Daten

Die Visualisierung der Daten und die Darstellung der untersuchten SNPs erfolgte mit Hilfe der Illumina GenomeStudio und KaryoStudio Software.

Die GenomeStudio Software stellt den SNP-Genotyp dar, indem ein sogenannter Genoplot generiert wird, bei dem die relative Häufigkeit eines Allels (Anzahl eines bestimmten

Allels dividiert durch die Gesamtzahl aller Allele) für jeden detektierten SNP in Form der *B Allele Frequency* (BAF) als lineare Interpolation zwischen 0 und 1 (0=AA, 0,5=AB, 1=BB) dargestellt wird (61). Als Referenz diente eine von Illumina generierte Standard-Allelfrequenz, die laut Angaben des Herstellers aus 200 DNA-Proben ermittelt wurde. Bei der Untersuchung von Tumorproben muss daher keine tumorfreie DNA als Referenz mitgeführt werden. Die SNPs sind vom Hersteller so ausgewählt, dass ein heterozygoter Zustand des zu untersuchenden SNPs wahrscheinlich ist, d.h. beide Allele sind in der Referenz-Population gleich häufig zu finden. Dadurch ergibt sich eine heterozygote Standard-Allelfrequenz von $\sim 0,5$. Wird in der zu untersuchenden Tumorprobe über einen längeren Bereich eine Abweichung von der heterozygoten Allelfrequenz ($> 0,5$ oder $< 0,5$) detektiert, liegt ein Zugewinn, Verlust oder ein Verlust der Heterozygotie ohne Veränderung der Kopienzahl (engl.: *copy neutral loss of heterozygosity*, cnLOH) des entsprechenden Chromosomenabschnitts vor.

Zur Unterscheidung zwischen Zugewinn und Verlust wird mit Hilfe der GenomeStudio Software neben der Allelfrequenz auch die Signalintensität (R) der Probe mit der von Illumina generierten Referenz ($R_{\text{Probe}}/R_{\text{Referenz}}$; Log R Ratio) verglichen. Abweichungen von der Basislinie (generiert aus der Referenz) geben einen Hinweis auf numerische Veränderungen. Erhöht sich die Log R Ratio eines Chromosomenabschnitts, liegt ein Zugewinn bzw. eine Amplifikation der entsprechenden Region vor. Verringert sich die Log R Ratio im Vergleich zur Basislinie, kann von einem Verlust des entsprechenden Chromosomenabschnitts ausgegangen werden. Gibt es trotz Abweichung von der heterozygoten Allelfrequenz keine numerische Veränderung, liegt ein cnLOH vor, d.h. eine Kopie des Chromosomenabschnitts ist verloren gegangen, wohingegen die übrige Kopie dupliziert wurde. Mittels dieser Methode und vor allem durch die Generierung der B-Allelfrequenz können somit auch cnLOHs detektiert werden.

Konnten mittels der GenomeStudio Software Zugewinne, Verluste oder cnLOHs detektiert werden, wurden diese Regionen mit Hilfe der KaryoStudio Software in Bezug auf die darin liegenden Gene genauer betrachtet und analysiert.

3.3 Immunhistochemie

Zum Färben der FFPE-Schnitte wurde das Dako REAL Detection System verwendet, welches durch eine Phosphatase-Reaktion zu einer roten Färbung führt. Mit dem Mikrotom wurden zunächst 3 μm dicke Schnitte angefertigt und bei 60°C für 30 Min. deparaffiniert. Nachdem die Schnitte über Nacht getrocknet wurden, wurden sie weiter deparaffiniert, indem sie für 10 Min. in Xylol inkubiert wurden. Durch eine absteigende Alkoholreihe (zweimal 100% Ethanol, zweimal 96% Ethanol, einmal 70% Ethanol) wurden die Schnitte rehydriert. Im Anschluss wurden sie einmal mit 1x Tris-Puffer und einmal mit Wasser gewaschen, bevor sie für die Antigendemaskierung für 15 Min. in Citratpuffer gekocht wurden. Nachdem die Schnitte auf

Raumtemperatur abgekühlt waren, wurden sie 3-mal mit 1x Tris-Puffer gewaschen, bevor der primäre Antikörper auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Schnitte 3-mal in 1x Tris-Puffer gewaschen und mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (anti-Maus und anti-Kaninchen) aus Fläschchen A gut bedeckt. Die Inkubation erfolgte für 15 Min. bei Raumtemperatur, bevor 3-mal mit dem 1x Tris-Puffer gewaschen wurde. Die Schnitte wurden anschließend mit der Lösung aus Fläschchen B gut bedeckt, welche die mit Streptavidin konjugierte alkalische Phosphatase enthält. Die Inkubation erfolgte für 15 Min. bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden anschließend 3-mal mit 1x Tris-Puffer gewaschen, bevor sie mit einer Chromogen-Substrat-Lösung gut bedeckt und für 4-7 Min. inkubiert wurden. Nachdem die Schnitte 3-mal mit 1x Tris-Puffer gewaschen wurden, erfolgte die Gegenfärbung mit Hämatoxylin, indem die Lösung für 10 Sek. auf die Schnitte gegeben wurde und diese anschließend für 1 Min. mit lauwarmem Wasser gebläut wurden. Nach einem Waschschrift mit 1x Tris-Puffer wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (einmal 70% Ethanol, zweimal 96% Ethanol, zweimal 100% Ethanol) und Xylol dehydriert. Anschließend wurden die Schnitte mit Corbit Balsam und einem Deckgläschen eingedeckt und unter einem Lichtmikroskop ausgewertet.

3.4 miRNA Expressionsanalysen

Um die Expression von MicroRNAs (miRNAs) in den primären kardialen Angiosarkomen zu untersuchen, wurden TaqMan Low Density Assays (TLDA) verwendet. Dabei handelt es sich um einen, auf *real-time* PCR basierenden Assay, bei dem die Expression von 377 gut charakterisierten miRNAs sowie von drei endogenen Positiv- und einer Negativkontrolle quantifiziert werden kann. Bei den, auf TaqMan basierenden Assays wird zunächst aus der miRNA mit einer reversen Transkription (RT) einzelsträngige cDNA synthetisiert. Da miRNAs sehr kurz sind (~ 22 Nukleotide), sind sie für eine PCR-Reaktion mit gewöhnlichen Primern ungeeignet, da diese bereits etwa 20 Nukleotide lang sind. Daher wurden *stem-loop* RT-Primer entwickelt, die lediglich über 4 Basen spezifisch an das 3'-Ende der miRNA binden und durch den *stem-loop* eine thermisch stabile Bindung ermöglichen (62) (Abb. 5). Ein weiterer Vorteil dieser *stem-loop* Primer liegt darin, dass das 5'-Ende des neu synthetisierten cDNA-Strangs verlängert wird, der anschließend durch eine *real-time* PCR amplifiziert wird (Abb. 5). Bei der TaqMan-basierenden *real-time* PCR wird neben den spezifischen Vorwärts- und Rückwärtsprimern eine sogenannte TaqMan-Sonde verwendet. Diese Sonde ist ein Oligonukleotid, welches am 3'-Ende einen fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (F=Fluorescein) und am 5'-Ende einen *quencher* (Q), welcher die Fluoreszenzemission unterdrückt, gebunden hat. Der *quencher* ist zudem an einen sogenannten *minor groove binder* (MGB) gekoppelt, der sich nach der Hybridisierung der Sonde in die DNA einlagert. Dadurch wird die

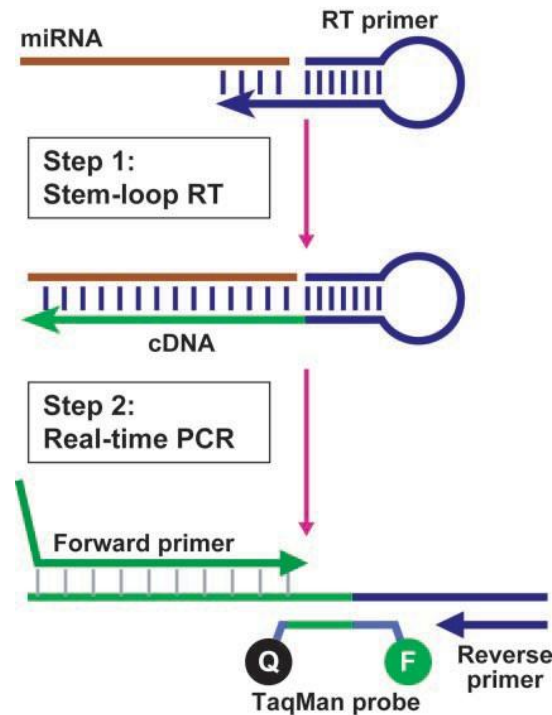


Abb. 5: TaqMan basierte real-time PCR.

Im ersten Schritt wird durch stem-loop Primer ein cDNA-Strang synthetisiert, der anschließend durch eine *real-time* PCR amplifiziert wird. Dabei werden neben den Primern Farbstoff-markierte TaqMan-Sonden verwendet. Quelle: Chen, (62).

Schmelztemperatur erhöht und eine stabilere Bindung der Sonde gewährleistet, was die Verwendung sehr kurzer Sonden ermöglicht (63). Während der PCR-Reaktion bindet neben dem Vorwärtsprimer auch die Sonde sequenzspezifisch an den DNA-Strang. Die Taq-Polymerase baut dann aufgrund ihrer 5'-3'-Exonukleaseaktivität die TaqMan-Sonde am 5'-Ende ab, sodass der *quencher* abgespalten wird und die Fluoreszenz proportional zur synthetisierten DNA gemessen werden kann.

Für die Durchführung der miRNA Expressionsanalysen wurde die RNA wie bereits beschrieben (siehe 3.1.2) isoliert und die miRNA zunächst mit Hilfe von TaqMan miRNA-Einzelassays auf ihre Amplifizierbarkeit untersucht.

3.4.1 Qualitätskontrolle mittels TaqMan miRNA-Einzelassay

Um zu kontrollieren, ob die Qualität der isolierten miRNA für die Durchführung des TaqMan Low Density Assays ausreichend ist, wurde zunächst ein TaqMan miRNA-Einzelassay durchgeführt. Dafür wurde die Expression der RNU48, eine im humanen Genom stabil exprimierte *small nuclear RNA* (snRNA), untersucht.

RT-Reaktion

Um die miRNA in cDNA umzuschreiben, wurde das TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit sowie der spezifische *stem-loop* RT-Primer für RNU48 verwendet. Die RT-Reaktion wurde wie folgt in einem 0,1 ml PCR-Gefäß angesetzt:

dNTPs (100 mM)	0,15 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/µl)	1,0 µl
RT Buffer (10x)	1,5 µl
RNase Inhibitor (20 U/µl)	0,19 µl
RNA-Probe (5 ng/µl)	2 µl
RT-Primer (5x)	3 µl
Nuklease-freies Wasser	ad 15 µl

Der Ansatz wurde durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gut gemischt und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde im Thermozykler wie folgt inkubiert:

Temperatur	Zeit
16°C	30 Min.
42°C	30 Min.
85°C	5 Min.
4°C	∞

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Real-time PCR Reaktion

Für die TaqMan-basierte *real-time* PCR-Reaktion wurde die eingefrorene cDNA-Probe auf Eis aufgetaut und folgender Ansatz in einem 0,1 ml PCR-Gefäß angesetzt:

TaqMan Small RNA Assay, RNU48 (20x)	1 µl
RT-Produkt	1,33 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	10 µl
Nuklease-freies Wasser	7,67 µl

Der Ansatz wurde durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gut gemischt und anschließend wurde die PCR im StepOne Real-Time PCR System wie folgt durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung und Enzymaktivierung	95°C	10 Min.	-

Denaturierung	95°C	15 Sek.	} 40
Annealing/Elongation	60°C	1 Min.	
Kühlung	4°C	∞	-

Proben mit einem Ct-Wert ≤ 25 konnten für die anschließende Expressionsanalyse verwendet werden.

3.4.2 TaqMan Low Density Assay

RT-Reaktion

Um die miRNA in cDNA umzuschreiben, wurde das TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit sowie Megaplex RT Primer verwendet. Die RT-Reaktion wurde wie folgt in einem 0,1 ml PCR-Gefäß angesetzt:

Megaplex RT Primer (10x)	0,8 μ l
dNTPs (100 mM)	0,2 μ l
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μ l)	1,5 μ l
RT Buffer (10x)	0,8 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	0,9 μ l
RNase Inhibitor (20 U/ μ l)	0,1 μ l
RNA-Probe (500 ng)	1 μ l
Nuklease-freies Wasser	2,2 μ l

Der Ansatz wurde durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gut gemischt und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde im Thermozykler wie folgt inkubiert:

Temperatur	Zeit	Zyklen
16°C	2 Min.	} 40
42°C	1 Min.	
50°C	1 Sek.	
85°C	5 Min.	-
4°C	∞	-

Die cDNA wurde für maximal eine Woche bei -20°C gelagert.

Real-time PCR Reaktion

Für die TaqMan-basierte *real-time* PCR-Reaktion wurde die eingefrorene cDNA-Probe auf Eis aufgetaut und folgender Ansatz in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorbereitet:

TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	450 µl
Megaplex RT-Produkt	6 µl
Nuklease-freies Wasser	444 µl

Der Ansatz wurde zum Mischen 6-mal invertiert und anschließend kurz anzentrifugiert. Die Reaktion erfolgte in der 384-Well Platte des TaqMan Human MicroRNA Array A 2.0, welcher 8 Beladungstaschen besaß, die wiederum über Kanäle mit je 48 Wells verbunden waren (siehe Anhang: Abb. 29). In jedem Well waren für eine bestimmte miRNA die entsprechenden Primer und TaqMan-Sonden vorgelegt. In jede Tasche wurden 100 µl des Reaktionsansatzes pipettiert und durch zweimaliges Zentrifugieren bei 1.200 rpm für jeweils 1 Min. wurde die Probe gleichmäßig in alle 384 Wells verteilt. Die Wells der Platte wurden anschließend mit Hilfe eines Versieglers verschlossen und die PCR im ABI prism 7900 HAT RealTime-PCR System mit folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Enzymaktivierung	50°C	2 Min.	-
Initiale Denaturierung	94,5°C	10 Min.	-
Denaturierung	97°C	30 Sek.	} 40
Annealing/Elongation	59,7°C	1 Min.	
Kühlung	4°C	∞	-

3.4.3 Auswertung der miRNA Expressionsdaten

Nachdem die TLDA's für alle Proben durchgeführt worden waren, wurden die Daten mit Hilfe der ABI SDS 2.4 Software in einem *Amplification Plot* dargestellt und die *Baseline* zwischen Zyklus 3 und 15 eingestellt, d.h. Fluoreszenzen, die vor Zyklus 15 detektiert wurden, wurden als Hintergrund eingestuft. In der logarithmischen Darstellung des *Amplification Plots* wurde außerdem der *Threshold* (Fluoreszenz stärker als das Hintergrundsignal) auf 0,1 manuell eingestellt. Der Zyklus, in dem die Fluoreszenz den *Threshold* erreicht, ergibt den Ct-Wert, mit dem Rückschlüsse auf differentielle Expressionsmuster gezogen werden können. Als Grenze der detektierbaren Fluoreszenz wurde ein Ct-Wert von 35 festgelegt. Hohe Ct-Werte kommen durch schwach exprimierte miRNAs zustande, wodurch es in den Duplikaten zu Schwankungen in den Ct-Werten kommt. Ct-Werte über 35 wurden deshalb auf 35 gesetzt. Als endogene Kontrolle diente die snRNA U6, anhand derer die Ct-Werte normalisiert wurden ($\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Probe}} - \text{Ct}_{\text{Kontrolle}}$).

Für die Analyse der Expressionsmuster der 377 miRNAs sollten die *Array*-Daten der kardialen Angiosarkome ursprünglich mit denen endothelialer Zellen verglichen werden. Da jedoch aus kardialen Gefäßen nur geringe Mengen miRNA isoliert werden konnten und die

Qualität nicht ausreichend war, wurden die *Array*-Daten der kardialen Angiosarkome mit denen der kardialen Sarkome NOS verglichen. Durch den Vergleich mit einer anderen Tumorentität konnten zumindest potentiell differentiell exprimierte miRNAs bei den kardialen Angiosarkomen identifiziert werden. Für diesen Vergleich wurden die zuvor bearbeiteten Daten mittels der StatMiner Software von Integromics analysiert. Zunächst wurde eine nicht-überwachte (engl.: *unsupervised*) Clusteranalyse durchgeführt. Dabei wurden die miRNA-Expressionsmuster aller Proben unabhängig von ihrer Sarkomentität auf ihre Ähnlichkeit zueinander untersucht. Sofern sich zwei Gruppen deutlich voneinander unterscheiden, kann ein Vergleich der miRNA-Expression durchgeführt werden. Durch die StatMiner Software wurden die Delta-Ct-Werte der einzelnen miRNAs für jede Probe aufgelistet. Die differentielle miRNA-Expression wurde durch die Software ermittelt, indem die durchschnittlichen Delta-Ct-Werte der Referenz (Sarkome NOS) von denen der kardialen Angiosarkome subtrahiert wurden. Dies ergibt den Delta-Delta-Ct-Wert. Der sogenannte Veränderungsfaktor (*Fold Change*) der Expression wurde durch die Software in Form des Log10RQ-Wertes angegeben und wurde für die Darstellung in dieser Arbeit entlogarithmiert. Bei der Auswertung wurden nur die miRNAs berücksichtigt, die sich in ihrer Expression mit einem Signifikanzwert von mindestens $p=0,05$ von der Referenz unterschieden. Für die Ermittlung dieses p-Wertes wurde die Benjamini-Hochberg *false discovery rate* (FDR)-Methode verwendet, mit der die Signifikanzen in Form der p-Werte ermittelt und durch die FDR-Methode um falsch-positive Ergebnisse korrigiert wurden (64).

3.5 Next Generation Sequencing mittels der Ion Torrent Plattform

Das Sequenzieren der nächsten Generation (engl.: *Next Generation Sequencing*, NGS) beruht auf der Parallelsequenzierung von Millionen von Sequenzen in einem einzigen Sequenzierungslauf. Da nur wenig Tumormaterial in Form von FFPE-Gewebe zur Verfügung stand, wurde das *targeted* NGS (tNGS) angewendet. Spezielle Primer-Gemische ermöglichen dabei die Amplifikation kurzer DNA-Fragmente (100-200 bp) für eine gezielte Mutationsanalyse von Genen, die eine Rolle bei der Pathogenese von Tumoren spielen können. Mit Hilfe des Comprehensive Cancer Panels der Ion Torrent Plattform (Life Technologies) konnten Mutations-Hotspots (häufig mutierte Genabschnitte) in den 409 am häufigsten mutierten Tumorsuppressor- und Onkogenen untersucht werden (siehe Anhang: Tab. 5). Zunächst wurde die DNA aus dem FFPE-Gewebe der Patientenproben isoliert (siehe 3.1.1). Für die Auswertung der Sequenzen und zur Unterscheidung zwischen SNPs und *single nucleotide variants* (SNVs) wurde neben der DNA des Tumors auch tumorfreie DNA gewonnen und ebenso mittels Ion Torrent sequenziert. Das tNGS erfolgte in 3 Schritten: 1. Herstellung der DNA-library, 2. Klonale Amplifikation und 3. Sequenzierungsreaktion.

3.5.1 Herstellung der DNA-Library

Amplifikation der Ziel-Fragmente

Die aus dem FFPE-Gewebe isolierte DNA wurde zunächst auf eine Konzentration von 10 ng/μl eingestellt. Zur Amplifikation der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurde die PCR wie folgt angesetzt:

5x Ion AmpliSeq HiFi Master Mix	4 μl
2x Ion AmpliSeq Primer Pool (1-4)	10 μl
genomische DNA, 10 ng	1 μl
Nuklease-freies Wasser	ad 20 μl

Das Comprehensive Cancer Panel besteht aus 4 Primer Mixen (je 4.000 Primer Paare), sodass insgesamt 16.000 Primer Paare die 409 zu untersuchenden Gene abdecken. Für jede Probe wurden dementsprechend 4 *DNA-libraries* hergestellt. Die PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	99°C	2 Min.	-
Denaturierung	99°C	15 Sek.	15
Annealing/Elongation	60°C	8 Min.	
Kühlung	10°C	∞	-

Das PCR-Produkt wurde bei -20°C gelagert.

Partieller Verdau der Primer-Sequenz

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die speziell modifizierten Primer-Sequenzen partiell verdaut, um die nachfolgende Ligation der Adapter zu gewährleisten. Hierzu wurden 2 μl des FuPa-Reagenz (Enzym-Mix) zum PCR-Ansatz gegeben, durch auf- und abpipettieren gemischt und wie folgt inkubiert:

50°C	10 Min.
55°C	10 Min.
65°C	20 Min.
10°C	bis zu 1 Std.

Adapter-Ligation und Aufreinigung

Alle DNA-Fragmente wurden mit zwei Adaptern (P1 und A) versehen (Abb. 6), die für die nachfolgende klonale Amplifikation sowie die Sequenzierungsreaktion notwendig sind. Der Reaktionsansatz für die Adapter-Ligation wurde wie folgt angesetzt:

Probe (nach Verdau)	22 µl
Switch Solution	4 µl
Ion AmpliSeq Adapters	2 µl
DNA Ligase	2 µl

Der Ligationsansatz wurde für 30 Min. bei 22°C und anschließend für 10 Min. bei 72°C inkubiert. Die Proben konnten bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert werden.

Zum Entfernen überschüssiger Primer und Adapter sowie Salze wurden magnetische *beads* (Agencourt AMPure XP Reagent) zur Aufreinigung verwendet. Dabei wurden DNA-Fragmente, die mind. 100 bp lang sind, an die *beads* gebunden, gewaschen und anschließend eluiert. Die Bindung der DNA an die *beads* erfolgt über Carboxylgruppen, mit denen die *beads* bedeckt sind. Durch einen Puffer, der u.a. Polyethylenglycol (PEG) enthält, wird eine Größen-abhängige Fällung der DNA ermöglicht. Je höher die Konzentrationen an PEG ist bzw. je mehr vom Agencourt AMPure XP Reagent eingesetzt wird, umso kürzere Fragmente werden gefällt und binden an die *beads*. Je geringer die Konzentration ist bzw. je weniger vom Agencourt AMPure XP Reagent eingesetzt wird, desto größere Fragmente werden gefällt und binden an die *beads* (65; 66).

Nach der Ligation wurde die *library* zunächst in ein 1,5 ml DNA-LoBind-Reaktionsgefäß überführt und 45 µl des Agencourt AMPure XP Reagents hinzugegeben. Der Ansatz wurde 5-mal auf- und abpipettiert und anschließend 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß in den DynaMag-Magneten gesetzt und für 3 Min. inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die *beads* wurden durch Zugabe von 150 µl 70% Ethanol gewaschen, indem das Reaktionsgefäß zweimal im Magneten gedreht wurde. Der Überstand wurde abgenommen und der Waschschrift wiederholt. Nach dem zweiten Waschschrift wurde das gesamte Ethanol entfernt und die *beads* im Magneten für 5 Min. luftgetrocknet.

Eluieren und Amplifizieren der aufgereinigten DNA-Fragmente

Zum Eluieren der DNA von den magnetischen *beads* wurde das Reaktionsgefäß aus dem Magneten entnommen und die *beads* in 50 µl des PCR SuperMix High Fidelity sowie 2 µl des Library Amplification Primer Mix resuspendiert. Für 2 Min. wurde die Probe ein weiteres Mal

in den Magneten gesetzt und der klare Überstand (~ 50 µl) in ein PCR-Gefäß überführt. Die PCR wurde anschließend nach folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	2 Min.	-
Denaturierung	98°C	15 Sek.	} 5
Annealing/Elongation	60°C	1 Min.	
Kühlung	10°C	∞	-

Das PCR-Produkt wurde bei -20°C gelagert.

Aufreinigung der amplifizierten Library

Durch einen weiteren Aufreinigungsschritt mit Hilfe der magnetischen *beads* wurden zuerst die Input-DNA und anschließend die überschüssigen Primer der letzten PCR-Reaktion entfernt. Dafür wurde das PCR-Produkt in ein 1,5 ml DNA-LoBind-Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µl des *Agencourt AMPure XP Reagent* gemischt, für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 5 Min. in den Magneten gesetzt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, da dieser die Amplifikate enthielt. Die hoch-molekulare DNA wurde hingegen gefällt und an die *beads* gebunden und konnte somit verworfen werden. Zum Überstand wurden anschließend 60 µl des *Agencourt AMPure XP Reagents* gegeben und gemischt, bevor eine Inkubation für 5 Min. im Magneten erfolgte. Dabei wurden DNA-Fragmente mit einer Länge von mind. 100 bp gefällt und an die *beads* gebunden. Im Anschluss wurde der Überstand mit den Primern entfernt und die *beads* zweimal mit 70% Ethanol gewaschen (siehe Adapter Ligation und Aufreinigung). Das Eluieren der DNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl Low TE und eine Inkubation im Magneten für 5 Min. Die *DNA-libraries* wurden bei -20°C gelagert.

Quantifizierung mittels Agilent Bioanalyzer

Zur Quantifizierung wurde 1 µl der *library* mit dem Agilent High Sensitivity DNA Kit entsprechend der Angaben des Herstellers analysiert. Dabei wird die DNA der Größe nach aufgetrennt und in einem Elektropherogramm sowie in einem virtuellen Gel-Bild visualisiert. Dafür sollten nicht mehr als 500 pg/µl verwendet werden, sodass zunächst eine Konzentrationsbestimmung mit dem Qubit dsDNA HS Assay Kit (siehe 3.1.3) durchgeführt und die Konzentration angepasst wurde. Die Analyse der DNA-Fragmente mit dem Agilent Bioanalyzer sollte ein Elektropherogramm mit multiplen Peaks zwischen 125-300 bp ergeben. Diese Peaks stellen die Amplifikate der Multiplex-PCR-Reaktion dar, die entsprechend des Primer-Mixes um 200 bp lang sein sollten. Nach Bestimmung der molaren Konzentration wurde die Verdünnung ermittelt, um eine Endkonzentration von 20 pM einzustellen.

Die mit den 4 Primer-Mixen hergestellten *libraries* einer Tumorprobe konnten nach der Quantifizierung und Verdünnung für die anschließende klonale Amplifikation zu gleichen Teilen vereint werden.

3.5.2 Klonale Amplifikation

Für die klonale Amplifikation und die nachfolgende Sequenzierungsreaktion mussten die DNA-Fragmente über den Adapter P1 an kleine Kügelchen, die sogenannten *Ion Sphere Particles* (ISPs), gebunden werden (Abb. 6). Die Bindung wird dadurch gewährleistet, dass sich an den ISPs komplementär zum Adapter P1 eine kurze Sequenz (P1-Oligo/Vorwärtsprimer) befindet, die zum einen der Bindung dient und zum anderen für die klonale Amplifikation als Primer fungiert. Ausgehend vom P1-Oligo findet die Synthese des neuen DNA-Strangs statt. Nach der Denaturierung bindet das Ausgangs-DNA-Fragment an ein neues P1-Oligo am gleichen ISP und die Synthese startet von neuem. Der neu synthetisierte Strang bleibt am ISP

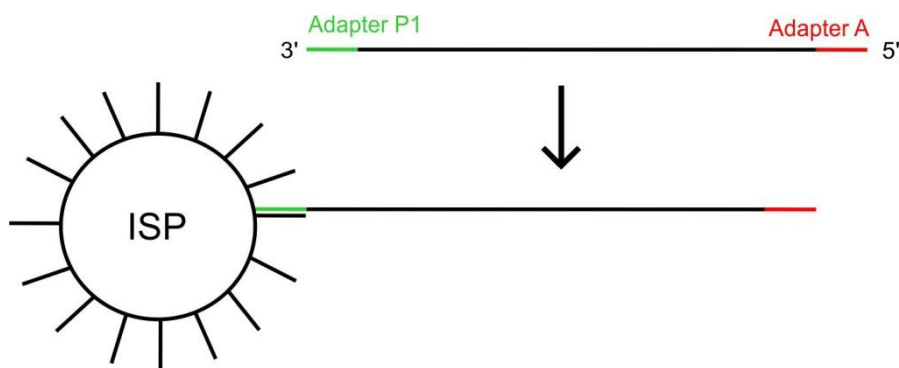


Abb. 6: DNA-Fragmente binden über den Adapter P1 an die ISPs.

haften und durch einen Rückwärtsprimer, welcher an die Sequenz des Adapters A bindet, beginnt auch an diesem Strang die Synthese. Zudem ist der Rückwärtsprimer mit Biotin gekoppelt, wodurch DNA-gebundene ISPs (positive ISPs) über Streptavidin gekoppelte, magnetische *beads* von den DNA-ungebundenen ISPs aufgereinigt werden können.

Emulsions-PCR

Die klonale Amplifikation erfolgte in Form einer Emulsions-PCR mittels des Ion OneTouch Instruments, d.h. die PCR-Reaktion findet in einem von Öl umschlossenen Wassertropfen (Mikroreaktionsraum) statt. Dafür werden die DNA-Fragmente und die ISPs so gemischt, dass sich in einem Mikroreaktionsraum durchschnittlich nur ein ISP und ein DNA-Fragment befinden. Es werden dadurch viele Mikroreaktionsräume geschaffen, in denen die unterschiedlichen DNA-Fragmente gleichzeitig amplifiziert werden können. Am Ende der

klonalen Amplifikation liegen Millionen ISPs vor, die ein spezifisches DNA-Molekül in mehrfachen Kopien gebunden haben.

Für die klonale Amplifikation wurde das Gerät zunächst entsprechend Herstellerangaben vorbereitet und die Amplifikations-Lösung wie folgt in einem 1,5 ml LoBind-Reaktionsgefäß angesetzt:

Nuklease-freies Wasser	280 µl
Ion OneTouch 2x Reagent Mix	500 µl
Ion OneTouch Enzym Mix	100 µl
Verdünnte Library, 20 pM	20 µl
Ion OneTouch 200 Ion Sphere Particle	100 µl

Die ISPs wurden vor der Zugabe 1 Min. durch Vortexen gemischt. Der gesamte Ansatz wurde nochmals für 5 Sek. durch Vortexen gemischt, kurz anzentrifugiert und anschließend in den *Ion OneTouch Plus Reaction Filter* pipettiert, welcher mit 1,5 ml *Reaction Oil* überschichtet wurde. Entsprechend der Angaben des Herstellers wurde dieser Filter in das Ion OneTouch Instrument eingesetzt und die Emulsions-PCR gestartet.

Aufreinigung der positiven ISPs

Nach der Emulsions-PCR wurden die ISPs in zwei *recovery tubes* durch Zentrifugation im Ion OneTouch Instrument gesammelt. Die *tubes* wurden anschließend aus dem Gerät entnommen und der Überstand (*Recovery Solution*) wurde in beiden *tubes* bis auf 50 µl abgenommen. Die ISP-Pellets wurden in diesen 50 µl resuspendiert und in einem neuen 1,5 ml LoBind-Reaktionsgefäß vereint. Die ISPs wurden durch die Zugabe von 1 ml *Ion OneTouch Wash Solution* gewaschen und bei 15.500 g für 2,5 Min. abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 100 µl abgenommen und das Pellet durch Vortexen für 10 Sek. darin resuspendiert. Die ISPs konnten anschließend für maximal 3 Tage bei 4°C gelagert werden.

Um die negativen ISPs, an die kein DNA-Fragment gebunden wurde, zu entfernen, folgte ein automatisierter Aufreinigungsschritt mit dem Ion OneTouch ES Instrument. Die Aufreinigung erfolgte in einem 8-Well Streifen, der wie folgt beladen wurde (Abb. 7):

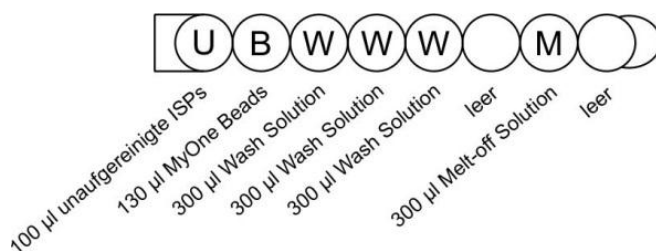


Abb. 7: Beladung des 8-Well Streifens für die Aufreinigung mit dem Ion OneTouch ES.

Quelle: Life Technologies, Ion OneTouch Template Kit User Guide.

Bei den MyOne Beads handelt es sich um Streptavidin gekoppelte *beads*, die vor der Beladung des 8-Well Streifens einmal gewaschen wurden. Hierfür wurden 13 µl der *beads* in 130 µl *MyOne Beads Wash Solution* resuspendiert und für 2 Min. in den DynaMag-Magneten gesetzt. Der Überstand wurde entfernt und die *beads* anschließend in 130 µl *MyOne Beads Wash Solution* resuspendiert. Die *Melt-off Solution* wurde immer frisch angesetzt:

Nuklease-freies Wasser	865 µl
1 M NaOH	125 µl
10% Tween 20 in Nuklease-freiem Wasser	10 µl

Der Ion OneTouch ES wurde entsprechend der Angaben des Herstellers gestartet und nach 30 Min. wurde die aufgereinigte Probe automatisch in ein 0,2 ml PCR-Gefäß überführt. Innerhalb von 15 Min. musste die Probe bei 15.500 g für 1,5 Min. abzentrifugiert und der Überstand bis auf 10 µl abgenommen werden. Zum Entfernen der *Melt-off Solution* folgte ein Waschschriff, bei dem 200 µl der *Ion OneTouch Wash Solution* hinzugegeben und die aufgereinigten ISPs nochmals bei 15.500 g für 1,5 Min. abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde bis auf 10 µl entfernt und mittels *Ion OneTouch Wash Solution* wurde das Volumen auf 100 µl eingestellt. Die Lagerung der aufgereinigten, positiven ISPs erfolgte bei 4°C für maximal 3 Tage.

Qualitätskontrolle

Nach der Emulsions-PCR wurde die Ausbeute der positiven ISP kontrolliert, um für die spätere Sequenzierung eine ausreichende Menge zu erreichen. Dafür wurde das Ion Sphere Quality Control Kit verwendet, mit dem die ISPs durch zwei fluoreszierende Farbstoffe markiert werden. Zum einen bindet ein mit Alexa Fluor 488 gekoppeltes Oligonukleotid an den Adapter P1 und zum anderen wird der Adapter A durch Bindung eines mit Alexa Fluor 647 gekoppelten Oligos markiert. Um die Menge der positiven ISPs zu bestimmen, wurden vor der Aufreinigung mit dem Ion OneTouch ES 2 µl und nach der Aufreinigung 10 µl der Probe in je ein 0,2 ml PCR-Gefäß überführt. Das *annealing* der Marker und die Messung mit Hilfe des Qubit 2.0 erfolgten entsprechend der Angaben des Herstellers. Der prozentuale Anteil der positiven ISPs wird mit Hilfe des Qubit 2.0 Easy Calculator Microsoft Excel Spreadsheet File automatisch kalkuliert. Die optimale Menge positiver ISPs sollte laut Angaben des Herstellers vor der Aufreinigung mit dem Ion OneTouch ES zwischen 10-30% und nach der Aufreinigung bei >50% liegen.

3.5.3 Sequenzierungsreaktion

Bei der DNA-Sequenzierungstechnologie der Ion Torrent Plattform handelt es sich um eine Halbleitersequenzierung basierend auf der Detektion von Protonen (67). Es wird eine einfache biologische Reaktion genutzt, um die Sequenz zu generieren: durch den Einbau der Nukleotide mit Hilfe der Polymerase werden Protonen freigesetzt. Diese bewirken eine pH-Wert-Änderung, welche wiederum detektiert und schließlich in die Sequenz übersetzt wird. Diese chemische Detektion wird dadurch ermöglicht, dass die aufgereinigten ISPs auf einen Chip (Ion 318 Chip) geladen werden (Abb. 8). Auf der Oberfläche des Chips befinden sich ca. 11 Millionen Mikrowells, in die je ein ISP hineinrollen kann, sodass in jedem besetzten Well die Sequenzierungs-Reaktion abläuft. Unterhalb der Wells befindet sich eine Protonen-sensitive Platte, wodurch pH-Wert-Änderungen detektiert werden können (Abb. 8). Die vorherige klonale

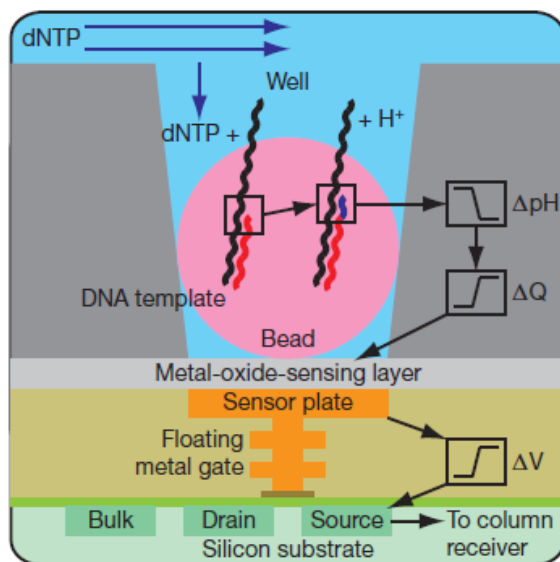


Abb. 8: Darstellung des Chip-Aufbaus anhand eines Mikrowells.
Quelle: Rothberg (67).

Amplifikation der DNA-Fragmente an den *beads* erhöht die Sensitivität und bewirkt eine Signalverstärkung. Der Chip wird während der Sequenzierung in einer bestimmten Reihenfolge mit den einzelnen Nukleotiden geflutet, sodass eine Unterscheidung der eingebauten Nukleotide erfolgen kann. Nach jedem Nukleotid wird der Chip gewaschen, um anschließend mit dem nächsten Nukleotid geflutet zu werden. Dies wiederholt sich etwa 500-mal, sodass eine komplette Sequenzierung der 100-200 bp langen Fragmente gewährleistet wird, was insgesamt einer Datenmenge von bis zu 10^9 bp entspricht.

Die Sequenzierung wurde mit dem Ion PGM System durchgeführt, welches entsprechend der Angaben des Herstellers vorbereitet wurde. Zunächst wurden die vorbereiteten ISPs mit den Sequenzierungsprimern versetzt und das *annealing* durchgeführt. Dafür wurde folgender Ansatz in einem 0,2 ml PCR-Gefäß vorbereitet:

Aufgereinigte, positive ISPs	100µl
Control Ion Sphere Particel	5 µl
Annealing Buffer	100µl

Der Ansatz wurde bei 15.500 g für 2 Min. abzentrifugiert, bevor der Überstand bis auf 15 µl entfernt wurde. Nach Zugabe von 12 µl der Sequenzierungsprimer wurde die Probe durch auf- und abpipettieren gemischt. Für das *annealing* wurde der Ansatz in einen Thermozykler gesetzt und für 2 Min. bei 95°C und anschließend für 2 Min. bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurde der Sequenzierungs-Chip entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet. Nach dem *annealing* der Sequenzierungsprimer wurden 3 µl der PGM Sequenzierungs-Polymerase zu den ISPs hinzugegeben und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Beladung des Chips und das Starten des Sequenzierungslaufs erfolgten entsprechend der Angaben des Herstellers.

3.5.4 Auswertung der NGS Daten

Nachdem die Rohdaten durch den Ion Torrent Server prozessiert wurden, bestand der erste Schritt Daten-Analyse darin, die sequenzierten DNA-Fragmente mit dem Referenzgenom (hg19) sowie mit den für das Comprehensive Cancer Panel spezifischen Ziel-Regionen abzugleichen. Dazu wurde ein *plugin* der Ion Torrent Plattform verwendet, der sogenannte Variant Caller. Durch diese Analyse wurden in einer Excel-Tabelle alle SNVs sowie Insertionen und Deletionen in Bezug auf die 409 zu untersuchenden Gene zusammengefasst. Zudem konnten die Sequenzen mit Hilfe der generierten Bam- und Bai-Files mit dem *Integrative Genomic Viewer* (IGV, Broad Institute) visualisiert werden.

Zur Unterscheidung zwischen SNVs und SNPs wurden die Sequenzierungs-Daten des Tumorgewebes mit denen des tumorfreien Gewebes abgeglichen. Die Varianten, die nur im Tumorgewebe zu finden waren, mindestens 20-mal sequenziert wurden und eine Mutationsfrequenz von 10% aufwiesen, wurden zunächst mittels IGV visualisiert und nach Region sortiert (Intron, Exon oder Homopolymer). Varianten, die sich in Homopolymer-Regionen befanden, konnten ausgeschlossen werden, da es sich im Allgemeinen um Fehler handelte, da bei einer starken pH-Wert Änderungen die genau Anzahl der repetitiven Nukleotide nicht bestimmt werden kann. Führt Varianten in codierenden Regionen zu einem Aminosäure-Austausch, wurden diese durch PCR und konventionelle Sanger-Sequenzierung verifiziert.

3.6 PCR und konventionelle Sequenzierung

Die Verifizierung der mit Hilfe des NGS detektierten Varianten erfolgte durch PCR und konventionelle Sanger-Sequenzierung. Dabei wurden die Sequenzen durch die Kettenabbruch-Methode generiert, indem Farbstoff-markierte Didesoxynukleotide durch die DNA-Polymerase in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut wurden. Für die Sequenzierung wurden die Primer für die entsprechenden Regionen mit Hilfe des Tm Calculators von ABI erstellt und von Eurofines synthetisiert.

3.6.1 Fast-PCR Reaktion

Die aus dem FFPE-Gewebe isolierte und bereits für das tNGS verwendete DNA wurde im Verhältnis 1 zu 10 in Nuklease-freiem Wasser verdünnt, bevor die Amplifikations-PCR wie folgt in einem 0,1 ml PCR-Gefäß angesetzt wurde:

Nuklease-freies Wasser	7 µl
Vorwärtsprimer, 5 pmol/µl	1 µl
Rückwärtsprimer, 5 pmol/µl	1 µl
2x GeneAmp Fast PCR Master Mix	10 µl

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde der PCR-Ansatz mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Fast-PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 Min.	-
Denaturierung	94°C	10 Sek.	} 40
Annealing/Elongation	63°C	20 Sek.	
Kühlung	4°C	∞	-

3.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR-Reaktion wurde das PCR-Produkt anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese visualisiert. Dafür wurde mit 0,5x TBE-Puffer ein 2%-iges Agarose-Gel gegossen, welchem 2 µl Ethidiumbromid zugefügt wurden. Das Gel wurde in die entsprechende Elektrophorese-Apparatur gesetzt, welche mit 0,5x TBE-Puffer befüllt wurde. 5 µl der PCR-Reaktion wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 1 µl 6x *Loading Dye* hinzugegeben und auf das Gel aufgetragen. Als Längenmarker wurde der GeneRuler Low

Range DNA Marker (25-700 bp) verwendet. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte bei 130 V, bis die Proben das untere Drittel des Gels erreichten.

3.6.3 Aufreinigung des PCR-Produkts und Sequenzierungs-PCR

Um überschüssige Primer und freie Nukleotide zu entfernen, folgte ein enzymatischer Aufreinigungsschritt mit ExoSAP-IT. Dafür wurden 10 µl des PCR-Produkts mit 4 µl ExoSAP-IT versetzt und für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte anschließend durch eine Inkubation bei 80°C für 15 Minuten.

Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Die Sequenzierungs-PCR wurde wie folgt angesetzt:

5x BigDye Puffer	7 µl
Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer (5 pmol/µl)	7 µl
Nuklease-freies Wasser	4,5 µl
BigDye Mix 3.1	1 µl
Aufgereinigtes PCR-Produkt	1 µl

Die Sequenzierungs-PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	96°C	60 Sek.	-
Denaturierung	96°C	10 Sek.	} 25
Annealing	50°C	5 Sek.	
Elongation	60°C	75 Sek.	
Kühlung	4°C	∞	-

Die PCR-Produkte wurden anschließend nochmals aufgereinigt. Dazu wurden DyeEx 2.0 Spin Säulen verwendet, die entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet wurden. Das PCR-Produkt wurde mit 10 µl aq. dest. gemischt und auf die Säule pipettiert. Diese wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und bei 2.800 rpm für 4 Min. abzentrifugiert. 10 µl des Durchflusses wurden anschließend im ABI 3730xl Genetic Analyzer durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Die Farbstoffe an den Nukleotiden werden durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt und diese detektiert. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Sequence Scanner v.10 (Life Technologies).

3.7 Mutagenese

Um die Konsequenzen der R707Q (c.2120G>A) Mutation in der C-terminalen SH2-Domäne der Phospholipase C- γ 1 (PLC γ 1) zu untersuchen, wurde die Mutation durch eine zielgerichtete in-vitro Mutagenese eingeführt. Als Ausgangsvektor diente ein PLC γ 1-Expressionsvektor, bei dem die Expression von PLC γ 1 unter der Kontrolle eines CMV-Promotors lag (Abb. 9).

Für die zu ändernde Position wurden ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer konstruiert. Diese mussten zu 100% komplementär sein und die Mutation sollte in beiden Primern zentral lokalisiert sein (Abb. 10). Die Primer wurden mit Hilfe des Custom Primer Service von Life Technologies (www.lifetechnologies.com/oligos) erstellt und von Eurofines synthetisiert. Die Mutagenese-Reaktion wurde mit dem GENEART Site-Directed Mutagenesis System durchgeführt. Der erste Schritt besteht darin, das Plasmid zu methylieren und während einer anschließenden Amplifikation die Mutation durch zwei komplementäre Primer einzubauen (Abb. 10). Die Methylierung ist für die spätere Selektion zwischen Input-Plasmid und mutiertem Plasmid notwendig. Durch die PCR-Reaktion wird das Plasmid linearisiert und nach einigen Zyklen entstehen PCR-Produkte mit dem mutierten Bereich an beiden Enden. Durch homologe Rekombination kann das Plasmid wieder in seine zirkuläre Form gebracht werden. Durch die anschließende Transformation in DH5 α -T1 chemisch kompetente Zellen werden nur unmethylierte, mutierte Plasmide in den Bakterien vervielfältigt, da die methylierte, zirkuläre Input-DNA durch die in den Bakterien enthaltene McrBC Endonuklease abgebaut wird.

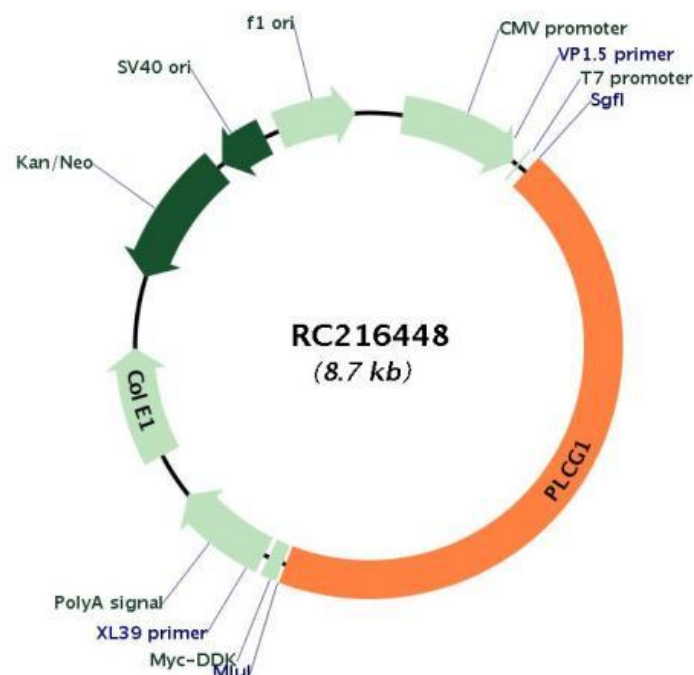


Abb. 9: Darstellung des PLC γ 1-Expressionsvektors von Origene.

PLC γ 1 wird unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit C-terminalem Myc/DDK-Tag exprimiert. Quelle: www.origene.com.

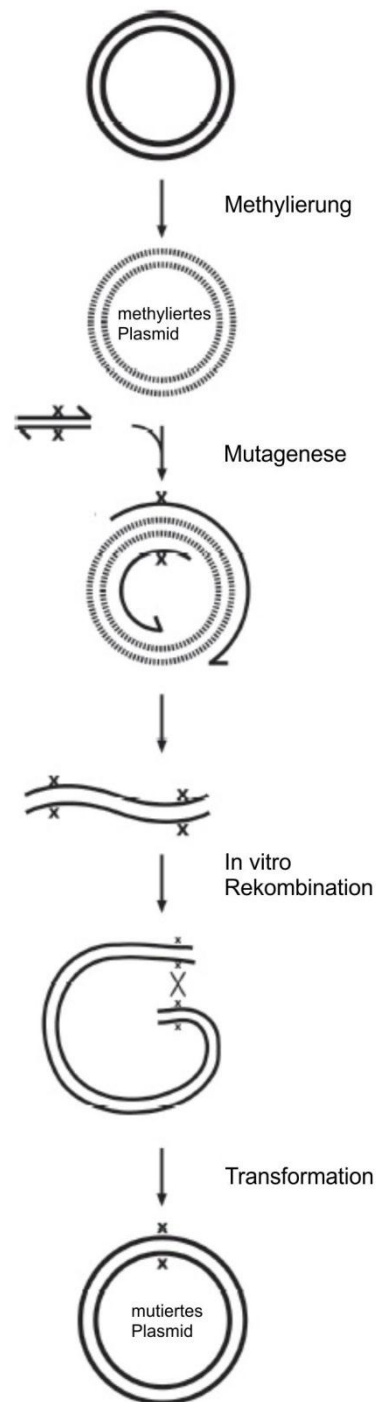


Abb. 10: Zielgerichtete in-vitro Mutagenese-Reaktion.

Quelle: Life Technologies, GeneArt Site-Directed Mutagenesis System User Guide.

3.7.1 Plasmid-Methylierung und Mutagenese-Reaktion

Im ersten Schritt der Mutagenese-Reaktion wurde das Plasmid methyliert und mittels Mutagenese-Primer amplifiziert, wodurch die zu mutierende Position eingeführt wurde. Die Methylierungs- und Mutagenese-Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

10x AccuPrime Pfx Reaction Mix	5 µl
10x Enhancer	5 µl
Primer Mix (je 10 pmol/µl)	1,5 µl
Plasmid DNA (20 ng/µl)	1 µl
DNA Methylase (4 U/µl)	1 µl
25x SAM	2 µl
AccuPrime Pfx (2,5 U/µl)	0,4 µl
Nuklease-freies Wasser	34,1 µl

Die Methylierungs- und Mutagenesereaktion wurde in einem Thermozykler mit folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Methylierung	37°C	20 Min.	-
Enzyminaktivierung	94°C	2 Min.	-
Denaturierung	94°C	20 Sek.	15-18
Annealing	57°C	30 Sek.	
Elongation	68°C	4 Min. 35 Sek.	
Kühlung	4°C	∞	-

Anschließend wurden 5 µl des PCR-Produkts zur Kontrolle auf ein 1%-iges Agarose Gel aufgetragen (siehe 3.6.2). Als Längenmarker diente der GeneRuler 1 kb Plus DNA Marker. Nachdem eine Bande bei ~ 9 kb detektiert wurde, folgte eine in-vitro Rekombinations-Reaktion, um das linearisierte PCR-Produkt in die zirkuläre Form zu bringen.

3.7.2 Rekombinations-Reaktion

Für die homologe Rekombination wurde folgende Reaktion in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß angesetzt:

5x Reaction Buffer	4 µl
PCR-Produkt	1-4 µl
10x Enzym Mix	2 µl
Nuklease-freies Wasser	ad 10 µl

Der Rekombinationsansatz wurde für 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Bis zur Transformation wurde der Ansatz auf Eis gelagert.

3.7.3 Transformation und Aufreinigung des mutierten Plasmids

Transformation in E.coli

Zur Vervielfältigung des mutierten Plasmids wurden DH5 α -T1 chemisch kompetente Zellen verwendet. Dafür wurde ein 50 μ l-Aliquot der Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut, bevor 2 μ l der Rekombinationsreaktion hinzugegeben wurden. Nach einer Inkubation für 12 Min. auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 30 Sek. bei 42°C, dem sich eine 2-minütige Inkubation auf Eis anschloss. Im Anschluss wurden 250 μ l SOC-Medium zu den Bakterien gegeben, die dann für 1 Std. bei 37°C und 225 rpm inkubiert wurden. Die gesamte Transformations-Reaktion wurde anschließend auf eine LB-Agar Platte ausplattiert. Da der PLC γ 1-Expressionsvektor eine Kanamycin/Neomycin-Resistenz aufweist, wurde der Agar vor dem Gießen der Platten mit 25 μ g/ml Neomycin versetzt. Die Inkubation der Platten erfolgte für 24-48 Std. bei 37°C.

Übernachtskultur und Glycerol-Stocks

Zur Vervielfältigung des mutierten Plasmids in den Bakterien wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Dazu wurde eine Kolonie von den Agar-Platten gepickt und in 10 ml LB-Medium, welchem 25 μ g/ μ l Neomycin beigelegt wurden, über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

Für die Langzeitaufbewahrung der transformierten Bakterien wurden Glycerol-Stocks angefertigt. Dafür wurden 500 μ l der Übernachtskultur mit 500 μ l einer 50%-igen Glycerol-Lösung in einem Kryo-Röhrchen gemischt und bei -80°C gelagert. Aus den Glycerol-Stocks konnten direkt neue Übernachtskulturen angesetzt werden, indem eine Pipettenspitze kurz in die Bakterien getaucht und in 10 ml LB-Medium überführt wurde.

Plasmidpräparation

Die Aufreinigung des mutierten Plasmids erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Mini Kit. Dafür wurden zunächst 4 ml der Bakterienkultur in einem 15 ml Reaktionsgefäß für 5 Min. bei 4°C und 6.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Bakterienpellet in 300 μ l Puffer P1 resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden 300 μ l Puffer P2 hinzugegeben, durch Invertieren gemischt und für 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 300 μ l Puffer P3. Die Probe wurde durch Invertieren gemischt, für 5 Min. auf Eis inkubiert und anschließend für 10 Min. bei 4°C und 13.200 rpm abzentrifugiert. In dieser Zeit wurden die Qiagen-Säulen auf ein 15 ml Reaktionsgefäß gesetzt und entsprechend der Angaben des Herstellers vorbereitet. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand auf die Säule gegeben. Die DNA wurde durch Ionen-Wechselwirkungen an die Säule gebunden und der Durchfluss im 15 ml Reaktionsgefäß gesammelt und später verworfen. Die Säule wurde zweimal mit 2 ml QC-Puffer gewaschen, bevor die DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 800 μ l QF-Puffer eluiert wurde. Die Fällung der DNA erfolgte durch

Zugabe von 560 µl Isopropanol. Nachdem die Probe gut gemischt worden war, wurde sie für 45 Min. bei 4°C und 13.200 rpm abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend einmal mit 70% Ethanol gewaschen und nochmals für 10 Min. bei 4°C und 13.200 rpm abzentrifugiert. Nachdem das Pellet für ca. 5 Min. luftgetrocknet worden war, konnte es in 20 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst werden. Die Konzentrations-Bestimmung erfolgte mittels Nanodrop.

3.7.4 Kontrolle der Transformation und Mutagenese

Zur Kontrolle der Plasmidpräparation wurde ein Verdau mit dem Restriktionsenzym XhoI durchgeführt. Dafür wurde folgender Ansatz für mind. 1,5 Std. bei 37°C inkubiert:

Nuklease-freies Wasser	6,5 µl
10x Restriktionspuffer	1 µl
BSA (10 µg/µl)	0,5 µl
Plasmid (100 ng/µl)	1 µl
XhoI	1 µl

Nach der Inkubation wurden 5 µl des Restriktions-Ansatzes auf ein 1%-iges Agarose Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.6.2). Der PLCγ1-Expressionsvektor besitzt zwei Schnittstellen für XhoI, sodass zwei Banden detektiert werden sollten (4000bp und 4700bp).

Zur Kontrolle der Mutagenese-Reaktion wurde der entsprechende Bereich mittels konventioneller Sanger-Sequenzierung überprüft (siehe 3.6).

3.8 Zellkultur

3.8.1 Kultivierung der HEK293-Zelllinie und der primären endothelialen Zellen

Die humane embryonale Nierenkarzinom-Zelllinie (engl.: *human embryonic kidney 293 cells*, HEK293) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die Kultivierung der HEK293 Zellen erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 20 ml RPMI Medium, welches mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptavidin versetzt wurde. Da Angiosarkome aus endothelialen Zellen hervorgehen, wurden die funktionellen Analysen vor allem mit humanen endothelialen Nabelschnurzellen (engl.: *human umbilical vein endothelial cells*, HUVECs) durchgeführt. Es handelt sich dabei um primäre Zellen, die in Form

von Kryo-Stocks von PromoCell bezogen wurden. Die HUVECs wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen mit 5 ml endothelialem Medium (engl.: *endothelial cell growth medium*, ECGM) kultiviert. Diesem Medium wurde neben 1% Penicillin/Streptavidin ein Supplement Mix beigelegt, welcher Wachstumsfaktoren optimiert für endotheliale Zellen enthält (0,1 ng/ml EGF, 1 ng/ml bFGF). Alle verwendeten Zellen wurden bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

Bei den HEK293-Zellen und den HUVECs handelt es sich um adhärenz Zellen, jedoch ist eine Trypsinierung zum Ablösen der Zellen nur bei den HUVECs notwendig. Zum Passagieren der HEK293 Zellen wurde das verbrauchte Medium entfernt und die Zellen mit der Zugabe von frischem, vorgewärmtem Medium vom Boden gelöst. Nach mehrmaligem resuspendieren wurden die Zellen 1:20 verdünnt und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Für das Passagieren der HUVECs wurde das DetachKit von PromoCell verwendet, welches eine HBSS-, eine Trypsin/EDTA- und eine Trypsin-Neutralisierungs-Lösung enthält. Vor der Trypsin-Behandlung wurden die Zellen einmal mit 2 ml HBSS gewaschen, ehe sie mit 2 ml Trypsin für 1 Min. bei 37°C inkubiert wurden. Durch Zugabe des gleichen Volumens der Trypsin-Neutralisierungs-Lösung wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 800 rpm für 3 Min. abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml vorgewärmtem ECGM aufgenommen, um anschließend mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahl zu bestimmen. Es wurden entweder $1,25 \cdot 10^5$ oder $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt. Das Passagieren der HEK293-Zellen und HUVECs erfolgte alle 2-3 Tage. Da primäre Zellen in Kultur nur ein begrenztes Teilungspotential haben, wurden die HUVECs nur bis Passage 10 verwendet.

3.8.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zur Langzeitaufbewahrung der HEK293 Zellen wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen verwendet. Zunächst wurden die HEK293 Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, ehe sie vom Boden gelöst und gezählt wurden. Die Zellen wurden anschließend bei 800 rpm abzentrifugiert und $2 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml *recovery-cell culture freezing medium* aufgenommen. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in ein Kryo-Röhrchen überführt und in eine spezielle Kühlbox eingesetzt, welche durch das Befüllen mit Isopropanol ein langsames und gleichmäßiges Einfrieren der Zellen ermöglicht. Die Lagerung der Kühlbox erfolgte für 2-4 Tage bei -80°C, ehe die Kryo-Röhrchen zur Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-150°C) umgelagert wurden.

Im Gegensatz zum Einfrieren muss das Auftauen von Zellen schnell erfolgen. Hierzu wurden die Kryo-Röhrchen aus dem Flüssigstickstoff entnommen und für 2 Min. bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein Falcon-Röhrchen überführt, in welches 9 ml vorgewärmtes Medium vorgelegt wurden, und bei 800 rpm für 3 Min. abzentrifugiert. Im

Anschluss wurde das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Std. wurde das Medium erneuert. Die HUVECs wurden in kryokonservierter Form von PromoCell bezogen und wie die HEK293 Zellen aufgetaut. Im Anschluss wurden $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in 5 ml ECGM aufgenommen und in eine 25 cm² Zellkulturflasche überführt.

3.9 Nachweis von Proteinen durch Western Blot

3.9.1 Herstellung der Zelllysate

Zur Herstellung der Zelllysate wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst, gezählt und einmal in 1x PBS gewaschen. Zu je $1 \cdot 10^5$ Zellen wurden zunächst 50 µl 2x *Sample-Buffer* hinzugegeben und die Zellen darin resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschall lysiert, indem die Probe 3-mal für 3 Sek. bei einer Amplitude von 10% beschallt wurde. Die Zelllysate wurden bei -20°C gelagert.

3.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Fertiggelen. Die Gele wurden aus der Verpackung genommen, mit aq. dest. abgespült und der Kamm vorsichtig entfernt, bevor maximal 2 Gele in das XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System eingesetzt wurden. Die Apparatur wurde mit 1x MOPS-Puffer befüllt und die Gel-Taschen gut gespült. Vor dem Auftragen der Lysate wurden diese für 10 Min. bei 70°C denaturiert. Nach kurzem Anzentrifugieren wurden 5 µl der Lysate auf das Gel aufgetragen. Neben den Proben wurde zum einen der Spectra Multicolor Broad Range Protein Marker aufgetragen (4 µl), welcher Farbstoff-markierte Proteine verschiedener Größen enthält, die während der Gelelektrophorese und nach dem Proteintransfer sichtbar sind. Zum anderen wurde der MagicMarker XP Western Protein Standard aufgetragen (3 µl). Die in diesem Marker enthaltenen Proteine können vom sekundären Antikörper gebunden werden, sodass die Markerbanden mittels Chemolumineszenz sichtbar gemacht werden können. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 V, bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

3.9.3 Proteintransfer

Zur Detektion der aufgetrennten Proteine wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine PVDF-Membran übertragen, indem senkrecht zum Gel ein elektrisches Feld angelegt wurde. Zunächst wurde die Membran für 10 Min. in Methanol aktiviert und anschließend kurz in aq. dest. gespült. Der Blot-Puffer (1x Towbin-Puffer) wurde etwa 1 Std. vor Gebrauch angesetzt und bei -20°C gekühlt. Vor dem Proteintransfer wurde die Blotting-Kassette wie ein Sandwich zusammengesetzt: Schwamm, in Blot-Puffer getränktes Filterpapier, Gel, PVDF-Membran, in Blot-Puffer getränktes Filterpapier, Schwamm. Die Kassette wurde in die Blot-Kammer eingesetzt, welche anschließend mit dem gekühlten Blot-Puffer befüllt wurde. Der Proteintransfer erfolgte gekühlt für 45 Min. bei 100 V.

3.9.4 Proteindetektion

Nach dem Transfer der Proteine auf die Membran wurde diese einmal für 2 Min. in TBST gewaschen. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran für mind. 1 Std. je nach Antikörper in 5% BSA oder 5% Milchpulver geblockt. Zur Detektion spezifischer Proteine wurde die Membran bei 4°C und über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Membran 3-mal für 5 Min. mit TBST gewaschen und für 1 Std. bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden sekundären HRP-gekoppelten Antikörper inkubiert. Die Membran wurde anschließend 4-mal für 5 Min. mit TBST gewaschen, bevor das Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent entsprechend der Angaben des Herstellers auf die Membran gegeben wurde, welche anschließend in Folie eingeschlagen und in eine Entwicklerkassette gelegt wurde. Durch das Auflegen eines Amersham Hyperfilm ECL konnten die Proteine durch die Chemolumineszenz-Reaktion auf dem Film sichtbar gemacht werden. Die Exposition erfolgte für 1 Sek. bis 10 Minuten. Im Anschluss wurde der Film zunächst in Entwicklerlösung und danach in Fixierlösung geschwenkt, bevor er mit Wasser gespült und anschließend getrocknet wurde.

Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mittels ImageJ-Software. Bei der Bestimmung der relativen Bandenstärke wurde die PLC γ 1-Bande zur Normalisierung verwendet, d.h. die zu untersuchenden Proteinmengen wurden an das PLC γ 1-Expressionslevel angepasst. Da für die funktionellen Untersuchungen der Vergleich der Proteinbanden zwischen den PLC γ 1-WT- und PLC γ 1-R707Q-Zelllysaten erfolgte, wurde der WT als Standard festgelegt und die relative PLC γ 1-R707Q-Menge im Vergleich zum WT ermittelt.

3.10 Funktionelle Untersuchungen mit HEK293-Zellen und primären endothelialen Zellen

3.10.1 Transiente Transfektion

Zum Transfizieren der HEK293 Zellen wurde das nicht-liposomale Transfektionsreagenz FuGene verwendet. Dabei wird die DNA durch ein Polymer in einen positiv geladenen Komplex verpackt, der durch Endozytose von den Zellen aufgenommen werden kann. Einen Tag vor der Transfektion wurden $5 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^5$ Zellen in eine 24-Well Platte ausplattiert, damit die Zellen ausreichend Zeit hatten sich am Boden anzuheften und um dadurch ein normales Proliferationsverhalten am Tag der Transfektion zu gewährleisten. Für den Transfektionsansatz wurde vorgewärmtes, Serum-freies RPMI-Medium verwendet. Pro Transfektion wurden 400 ng Plasmid und 2 µl FuGene (Volumen-Verhältnis DNA zu FuGene entspricht 1:5) eingesetzt und mit dem Serum-freien Medium auf ein Endvolumen von 100 µl gebracht. Der Transfektionsansatz wurde anschließend für 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und dann tröpfchenweise zu den vorbereiteten Zellen gegeben.

Die HUVECs wurden mit PromoFectin transfiziert. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine nicht-liposomale Transfektionsmethode. Die Zellen wurden 2-3 Tage vor der Transfektion in 6-Well Platten ($1 \cdot 10^5$ Zellen) oder 12-Well Platten ($5 \cdot 10^4$ - $7 \cdot 10^4$ Zellen) ausplattiert. Zum Ansetzen der Transfektion wurde *endothelial cell basal medium* verwendet, welches keine Zusätze enthält. Vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit 1 ml 1x PBS gewaschen und 2 ml des Basalen Mediums hinzugegeben. Für den Transfektionsansatz (24-Well) wurden 3 µg Plasmid und 6 µl PromoFectin in je 50 µl Basalmedium verdünnt, durch kurzes Vortexen gemischt und anzentrifugiert. Im Anschluss wurde der PromoFectin-Ansatz zum DNA-Ansatz gegeben und nochmals durch kurzes Vortexen gemischt und anzentrifugiert. Nach einer Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz (100 µl) tröpfchenweise zu den vorbereiteten Zellen gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen für 4 Std. im Brutschrank inkubiert, ehe das Basalmedium entfernt und durch 2 ml ECGM ersetzt wurde. Bei der Transfektion in 6-Well Platten wurden die Plasmid-Menge und alle Volumina verdoppelt.

3.10.2 IP-One ELISA

Um den Einfluss der PLC γ 1-R707Q-Mutation auf die Aktivität von PLC γ 1 zu untersuchen, wurde die Aktivierung des IP3-Signalweges mit einem IP-One ELISA untersucht. PLC γ 1 vermittelt die Freisetzung von Inositoltrisphosphat (IP3), welches an die IP3-Rezeptoren von

Ca^{2+} -Kanälen bindet, woraufhin Ca^{2+} freigesetzt wird. IP₃ wird jedoch innerhalb weniger Sekunden erst zu Inositolbisphosphat (IP₂) und dann zu Inositolmonophosphat (IP₁) abgebaut, welches anschließend zu Myo-Inositol degradiert (68). Durch die Verwendung von LiCl wurde die Degradierung von IP₁ zu Myo-Inositol inhibiert, sodass IP₁ in der Zelle akkumulierte und nachgewiesen werden konnte. Bei dem IP-One ELISA handelt es sich um einen kompetitiven ELISA, d.h. es wird kein markierter Zweitantikörper verwendet, sondern ein IP₁-HRP-Konjugat, welches mit dem freien IP₁ aus den Zellen konkurriert. Je mehr freies IP₁ vorhanden ist, desto weniger Konjugat bindet an den Antikörper auf der ELISA-Platte und desto geringer ist die spätere Farbreaktion. Somit kann indirekt die Freisetzung von IP₃ durch PLC γ 1 bestimmt werden.

Vor der Durchführung des ELISAs wurden die HEK293-Zellen in 24-Well Platten ausplattiert und wie bereits beschrieben transfiziert (siehe 3.10.1). 24 Std. nach der Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen mit einem LiCl-enthaltenden Puffer (100 μ l) für 1 Std. im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe eines 2,5%-igen Lyse-Reagenz (50 μ l) wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurden je 50 μ l in zwei Wells der ELISA-Platte überführt. Ein Antikörper (Anti-Maus IgG Antikörper aus Ziege) war bereits am Boden der ELISA-Platte gebunden. Zu dem Zelllysate wurden 25 μ l des IP₁-Antikörpers (monoklonal aus Maus) gegeben, welcher an den Anti-Maus IgG Antikörper bindet. Im Anschluss wurden 25 μ l des IP₁-HRP-Konjugats zum Lysat gegeben. Um später eine Standardkurve zu erhalten, wurden entsprechend der Angaben des Herstellers Standardlösungen mit bekannten Konzentrationen für IP₁ angefertigt und in die ELISA-Platte überführt. Zudem wurde eine Hintergrundkontrolle (kein IP₁-Antikörper) mitgeführt. Während einer 3-stündigen Inkubation bei Raumtemperatur und im Schüttler bei 200 rpm konkurrierte das Konjugat mit dem freien IP₁ um die Bindung am IP₁-Antikörper. Die ELISA-Platte wurde nach der Inkubation entsprechend der Angaben des Herstellers gewaschen, bevor das Substrat (100 μ l) für die enzymatische Farbreaktion hinzugegeben wurde. An dieser Stelle wurden eine positiv Kontrolle (Substrat + 5 μ l Konjugat) und eine negativ Kontrolle (nur Substrat) mitgeführt. Nach einer Inkubation für 25 Min. bei Raumtemperatur und im Dunkeln wurde die enzymatische Reaktion mit einer Stop-Lösung (100 μ l) abgestoppt. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) mit Hilfe des Absorptionslesegeräts für Mikrotiterplatten bei 450 nm und bei 690 nm (Referenzwellenlänge) gemessen. Die Messung der optischen Dichte bei 690 nm wurde verwendet, um Streuungen des Lichts durch Verunreinigungen in den Wells auszugleichen, indem die OD bei 690 nm von der OD bei 450 nm abgezogen wurde. Die gemittelten OD-Werte der einzelnen Proben wurden anschließend um den OD-Wert der Hintergrundkontrolle korrigiert. Mit den Werten der Standardlösungen konnte anschließend eine Standardkurve erstellt und die IP₁-Menge in den Proben ermittelt werden.

3.10.3 Migrations- und Invasionsassay

Um den Effekt der PLC γ 1-R707Q-Mutation auf das Migrations- und Invasionsverhalten der HUVECs zu untersuchen, wurden BioCoat Control Zellkultureinsätze sowie BioCoat Matrigel Invasionseinsätze verwendet. Diese Einsätze bestehen aus einer PET Membran mit 8 μ m großen Poren (Abb. 11). Bei den Invasionseinsätzen befindet sich auf der Membran eine Matrigel Matrix, welche die extrazelluläre Matrix nachbildet. Diese kann nur von invasiven Zellen passiert werden, da diese Enzyme (bspw. Matrix-Metalloproteinasen) exprimieren, die zur Degradierung und Remodellierung der extrazellulären Matrix erforderlich sind (69).

Bevor die Zellen in die entsprechenden Einsätze ausplattiert wurden, wurden diese wie bereits beschrieben transfiziert (siehe 3.10.1). Die Matrigel Matrix der Migrationseinsätze musste vor der Verwendung rehydriert werden. Dafür wurden die Einsätze in eine 24-Well Companion Zellkulturplatte gesetzt, mit Basalmedium bedeckt und für 2 Std. im Brutschrank inkubiert. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche gelöst (siehe 3.8.1), gezählt und die entsprechende Anzahl an Zellen ($2,5 \cdot 10^3$, $3 \cdot 10^3$ oder $5 \cdot 10^3$) in 500 μ l *endothelial cell basal medium* resuspendiert und in die Einsätze gegeben. Diese wurden in ein Well einer 24-Well Companion Zellkulturplatte gesetzt, in welches 750 μ l ECGM vorgelegt wurden (Abb. 11). Das ECGM in der unteren Medium-Kammer diente als Chemoattraktant für die Zellen. Nach 24 Std. wurde das Medium aus dem Einsatz entfernt und dieser aus der 24-Well Platte entnommen. Mit einem mit Medium befeuchteten Wattestäbchen wurden unter leichtem Druck die nicht migrierten bzw. nicht-invasiven Zellen entfernt. Die migrierten bzw. invasiven Zellen auf der Unterseite des Einsatzes wurden anschließend mittels Differential Quik Stain Kit fixiert und durch eine modifizierte Giemsa-Färbung entsprechend der Herstellerangaben gefärbt. Für die Zählung der Zellen wurde die Membran mit Hilfe eines Skalpells aus dem Einsatz entfernt, mittels Corbit Balsam auf einem Objektträger befestigt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Zählung der gefärbten, migrierten bzw. invasiven Zellen erfolgte unter einem Lichtmikroskop.

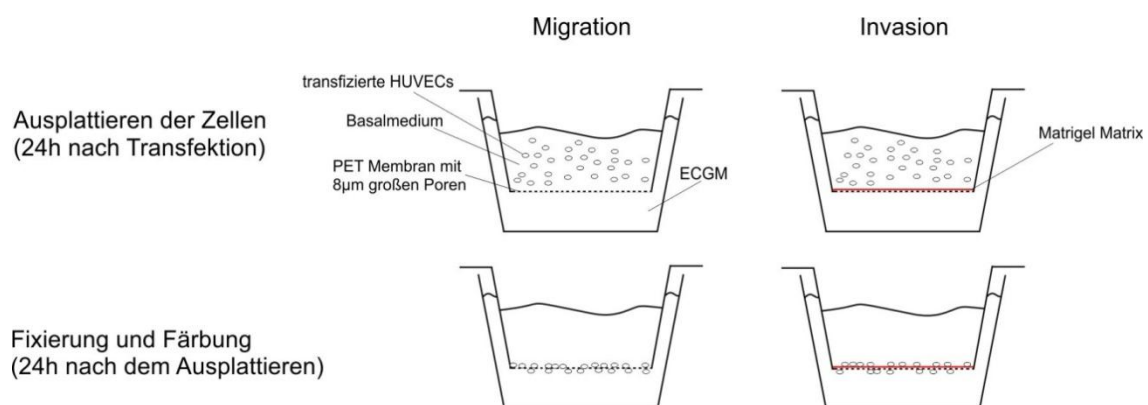


Abb. 11: Grafische Darstellung des Migrations- und Invasionsassays.

3.10.4 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können Eigenschaften von Zellen analysiert werden. Dabei werden einzelne Zellen durch hydrodynamische Fokussierung durch eine Kapillare gezogen und mit einem Laser bestrahlt. Jede Zelle erzeugt ein gewisses Streulicht (Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht), welches detektiert wird und wodurch Aussagen zur Größe und Granularität getroffen werden können. Neben dem Streulicht können auch Fluoreszenzsignale detektiert werden. Analysen basierend auf der Durchflusszytometrie wurden mit dem guava easyCyte Flow Cytometer entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

3.10.4.1 Transfektionseffizienz

Um die Effizienz der Transfektion in den HEK293-Zellen und den HUVECs zu bestimmen, wurden diese wie beschrieben (siehe 3.10.1) mit einem GFP-codierenden Plasmid transfiziert (pcDNA3-eGFP, 6 kb). Nach 24 Std. wurde die Intensität der grünen Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.10.4.2 Zellzyklus-Analyse

Um den Einfluss der PLC γ 1-R707Q Mutation auf die Proliferation von HEK293 und HUVECs zu untersuchen, wurden Zellzyklus-Analysen durchgeführt. Dafür wurde ein Propidiumiodid (PI)/RNase-Puffer zum Färben der Zellen, die zuvor fixiert und permeabilisiert worden waren, verwendet. Der fluoreszierende Farbstoff interkaliert in die DNA und somit nimmt die Fluoreszenzintensität proportional zum DNA-Gehalt zu. Dadurch konnten die Zellen in 3 Zellzyklus-Stadien unterteilt werden: G1-Phase (einfacher Chromosomensatz), S-Phase (DNA-Replikation) und G2-Phase (doppelter Chromosomensatz).

Für die Zellzyklus-Analyse wurden die Zellen wie beschrieben transfiziert (siehe 3.10.1) und nach 24 Std. fixiert und permeabilisiert. Die Fixierung der HEK293-Zellen erfolgte mit eiskaltem Aceton. Dafür wurden die Zellen in 1 ml 1x PBS aufgenommen und bei 300 g für 3 Min. abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Aceton resuspendiert und für 7 Min. bei -20°C fixiert, bevor die Zellen einmal mit 1 ml 1x PBS gewaschen wurden. Für die Fixierung der HUVECs wurden diese wie beschrieben trypsinisiert (siehe 3.8.1), bevor sie einmal mit 1x PBS gewaschen wurden. Das Zellpellet wurde in 500 μ l Ethanol (70%) resuspendiert und für 2 Std. bei -20°C fixiert. Die Zellen wurden anschließend einmal mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden in mind. 250 μ l der PI/RNase-Lösung resuspendiert und für 30 Min. im Dunkeln und bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend konnte die Fluoreszenzintensität direkt mit dem guava easyCyte Flow Cytometer gemessen werden.

3.10.4.3 Apoptose-Assay

Zur Untersuchung der Apoptose-Induktion nach Expression der PLC γ 1-R707Q-Variante wurden die HUVECs mit dem AnnexinV/ Dead Cell Apoptosis Kit gefärbt und mittels guava easyCyte Flow Cytometer analysiert. Dieses Kit enthält zum einen AnnexinV, das an Phosphatidylserin (PS) binden kann und zum anderen Propidiumiodid (PI), welches mit der DNA interkaliert und nicht in lebende Zellen eindringen kann. Wird die Apoptose in den Zellen induziert, wird Phosphatidylserin von der zytosolischen Membranseite auf die Zelloberfläche umgelagert. Dies dient der Erkennung apoptotischer Zellen durch Makrophagen und führt zur Phagozytose. AnnexinV ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit starker Affinität für PS. Da AnnexinV nicht in die Zellen eindringen kann, bindet es nur an PS, wenn dieses an die Zelloberfläche umgelagert wurde. Durch die Alexa Fluor 488-Markierung des AnnexinV können somit apoptotische Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden. Propidiumiodid dient als Marker für tote Zellen, da dieser nur in die Zellen eindringen kann, deren Zellmembran permeabilisiert ist. Durch die Nutzung beider Farbstoffe wird eine Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen und toten Zellen ermöglicht.

Für den Apoptose-Assay wurden die HUVECs transfiziert (siehe 3.10.1) und die Induktion der Apoptose sowohl mit als auch ohne Apoptose-auslösendes Zytostatikum untersucht, da primäre Zellen kein unbegrenztes Teilungspotential aufweisen und daher von sich aus in Apoptose gehen. Als Apoptose-auslösendes Zytostatikum wurde Cisplatin mit einer Konzentration von 45 μ M für 24 Std. eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen trypsiniert (siehe 3.8.1), in 1ml 1x PBS aufgenommen und gezählt. $1 \cdot 10^5$ Zellen wurden anschließend in 100 μ l 1x Annexin-binding Buffer aufgenommen, bevor 2,5 μ l des mit Alexa Fluor 488 markierten AnnexinV und 1 μ l der PI-Lösung (100 μ g/ml) dazu gegeben wurden. Der Ansatz wurde für 15 Min. bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden 400 μ l 1x Annexin-binding Buffer hinzugegeben und die Probe direkt mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.10.5 Liganden-Stimulation

Die Stimulation der transfizierten HUVECs erfolgte durch Verwendung des *endothelial cell growth medium 2* (ECGM2), welches höhere Konzentrationen an Wachstumsfaktoren (5 ng/ml EGF, 10 ng/ml bFGF, 20 ng/ml IGF, 0.5 ng/ml VEGF 165) als das ECGM (siehe 3.8.1) enthält.

Die Zellen wurden wie beschrieben transfiziert (siehe 3.10.1) und für 24 Std. mit ECGM kultiviert. Nach der Entfernung des ECGMs wurden die Zellen für 5 Min. mit ECGM2 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert (siehe 3.9.1) und der Einfluss der Stimulation auf die PLC γ 1-Signalkaskade mittels Western Blot (siehe 3.9) untersucht.

3.10.6 Phosphatase-Inhibierung

Zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus der mutierten Form von PLC γ 1 wurde der Protein-Tyrosin Phosphatase-Inhibitor Pervanadat eingesetzt. Die HUVECs wurden 24 Std. nach der Transfektion (siehe 3.10.1) für 1 Std. mit 100 μ M Pervanadat behandelt, ehe sie lysiert und mittels Western Blot (siehe 3.9) analysiert wurden.

4. Ergebnisse

4.1 SNP-Array-Analysen

Da die molekularen Mechanismen, die zur Pathogenese der kardialen Angiosarkome beitragen, weitgehend unbekannt sind, wurden 9 Fälle auf größere numerische Aberrationen mittels genomweiter SNP-Array Analyse untersucht. Dafür wurde die HumanOmniExpress-FFPE BeadChip Technologie von Illumina verwendet, bei der ca. 700.000 bekannte, hochkonservierte SNPs als Marker dienen und detektiert werden. Diese SNPs sind über das gesamte Genom verteilt und decken 97% der Gene ab, die in Tumoren häufig Aberrationen aufweisen. Neben den primären kardialen Angiosarkomen wurden auch 6 kardiale Sarkome NOS sowie ein Rhabdomyosarkom untersucht. Alle aus dem FFPE-Gewebe isolierten DNA-Proben besaßen eine ausreichende Qualität ($\Delta\text{Ct} < 5$) für den Array, was anhand des Infinium HD FFPE QC Kit ermittelt wurde (siehe 3.2.1).

Die Auswertung und Visualisierung der Daten erfolgte mit der Illumina GenomeStudio und KaryoStudio Software (siehe 3.2.7). Die gefärbten SNPs wurden mit Hilfe der GenomeStudio Software den Chromosomen zugeordnet, die in Form eines virtuellen Karyogramms rekonstruiert und auf Aberrationen untersucht wurden. Mit Hilfe der B-Allelfrequenz wurde die Häufigkeit eines Allels für jede markierte SNP-Position beschrieben und als lineare Interpolation zwischen 0 und 1 ($0=\text{AA}$, $0,5=\text{AB}$, $1=\text{BB}$) dargestellt. Die SNPs sind vom Hersteller so ausgewählt, dass ein heterozygoter Zustand des zu untersuchenden SNPs wahrscheinlich ist, d.h. beide Allele sind in der Referenz-Population gleich häufig zu finden. Daher ergibt sich eine heterozygote Standard-Allelfrequenz von $\sim 0,5$. Abweichungen von dieser Allelfrequenz ($> 0,5$ oder $< 0,5$) deuten auf chromosomale Aberrationen hin. Mit Hilfe der Log R Ratio, die sich aus dem Vergleich der Farbintensität zwischen der Probe und der von Illumina generierten Referenz ergab, konnten Aussagen zu numerischen Veränderungen getroffen werden. Zugewinne, Verluste oder cnLOHs von Chromosomenabschnitten, wurden mit der Illumina KaryoStudio Software in Bezug auf die darin liegenden Gene genauer betrachtet und analysiert.

Die Auswertung der einzelnen Aberrationen konnte nur bei 8 kardialen Angiosarkomen vorgenommen werden (Tab. 1), da ein Angiosarkom in allen Chromosomen komplexe Veränderungen zeigte. In allen kardialen Angiosarkomen konnten Zugewinne, Verluste oder cnLOHs festgestellt werden. Dabei konnten durchschnittlich 9 Aberrationen pro Fall detektiert werden (mindestens 2 und maximal 15 Aberrationen). Bei der Suche nach rekurrenten Aberrationen, die zur Pathogenese der kardialen Angiosarkome beitragen könnten, wurde in drei Fällen ein rekurrenter Zugewinn des gesamten q-Arms von Chromosom 1 identifiziert. Dies

wurde durch eine veränderte Allel-Zusammensetzung (B-Allel Frequenz) und durch die leichte Zunahme der Signalstärke im Vergleich zur der Basislinie 0 (Log R Ratio) deutlich (Abb.12). Aufgrund der Vielfalt der dort lokalisierten Gene wurde der 1q-Zugewinn jedoch nicht weiter analysiert. Ein kleiner Zugewinn auf dem q-Arm des Chromosoms 4 konnte in zwei kardialen Angiosarkomen mit einem überlappenden Bereich von 2 Mb detektiert werden.

Tab. 1: Übersicht über die numerischer Aberrationen von 8 primären kardialen Angiosarkomen.

Rekurrente Aberrationen sind durch eine hervorgehobene Schrift dargestellt. +: Zugewinn, -: Verlust, cnLOH: *copy neutral loss of heterozygosity*.

Fall	Aberrationen			
	gesamtes Chromosom	gesamter q- / p-Arm	Aberrationen > 2Mb	Aberrationen ≤ 2Mb
1	+8, +18, +X		1q+, 14q-, 17q+	1p-, 4q+ , 7p-, 16q-
2	+2, +8, +10, +11, +17	1q+ , 18q+	18p-, 18p+	4q-
3	+2, +4, +17	1q+	5q-, 10q+	
4	8 cnLOH, 13 cnLOH, 14 cnLOH, +18	1q+	2q+, 4p+, 4q+ , 11q+, 17q+	3p-
5	+2, +11, 17 cnLOH, 19 cnLOH, 20 cnLOH	12q+, 15q+	1q+, 6q-	
6	+8, +17		1p-, 2q-, 4q-	2p-, 4q-, 5q-, 12q-, 14q-
7	+1, -3, 7 cnLOH, -9, -12, -18, -19, -20, +X	13q-	2q-, 5q-, 14q-	1q+, 11q+
8			5q-, 13q-	

Mit Hilfe der KaryoStudio Software konnten die vom Zugewinn betroffenen Gene identifiziert werden. Sie sind in Abb. 13 A zusammen mit den Daten der GenomeStudio Software dargestellt. In diesem Bereich konnten 15 Gene identifiziert werden: *KIT*, *KDR*, *NMU*, *PDCL2*, *CLOCK*, *TMEM165*, *SRD5A3*, *CEP135*, *EXOC1*, *ARL9*, *SRP72*, *KIAA1211*, *PAICS*, *PPAT* und *AASDH*. Neben den Genen, die u.a. für regulatorische Proteine oder Stoffwechsel-Proteine codieren, konnten zwei Gene für Rezeptor-Tyrosinkinasen, *KIT* und *KDR*, identifiziert werden, die bereits als Onkogene bekannt sind.

Um zu untersuchen, ob der Zugewinn auf Chromosom 4 mit einer erhöhten Expression beider RTKs einhergeht, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt (Abb. 13 B und C). Die Expression von KDR konnte in allen untersuchten kardialen Angiosarkomen (n=8) nachgewiesen werden und reichte von einer schwachen Färbung (n=1, Abb. 13 C), über eine mittelmäßig starke Färbung (n=4) bis hin zu einer starken Färbung (n=3). In beiden Fällen mit dem kleinen Zugewinn auf Chromosom 4 konnte eine starke Expression von KDR im Gegensatz zu den Fällen ohne 4q-Zugewinn nachgewiesen werden (Abb. 13 B). Die Expression von KIT wurde in 5 Fällen untersucht, einschließlich beider Proben mit dem Zugewinn auf dem q-Arm von Chromosom 4. Dabei konnte lediglich in einem der beiden Fälle eine schwache Färbung beobachtet werden.

Insgesamt zeigte die genomweite Untersuchung der größeren chromosomalen Veränderungen in allen kardialen Angiosarkomen Aberrationen, wobei insgesamt zwei rekurrente Aberrationen identifiziert wurden. Insbesondere der kleine rekurrente Zugewinn auf Chromosom 4, könnte durch die daraus resultierende Überexpression von KDR eine Rolle bei der Pathogenese der Angiosarkome spielen.

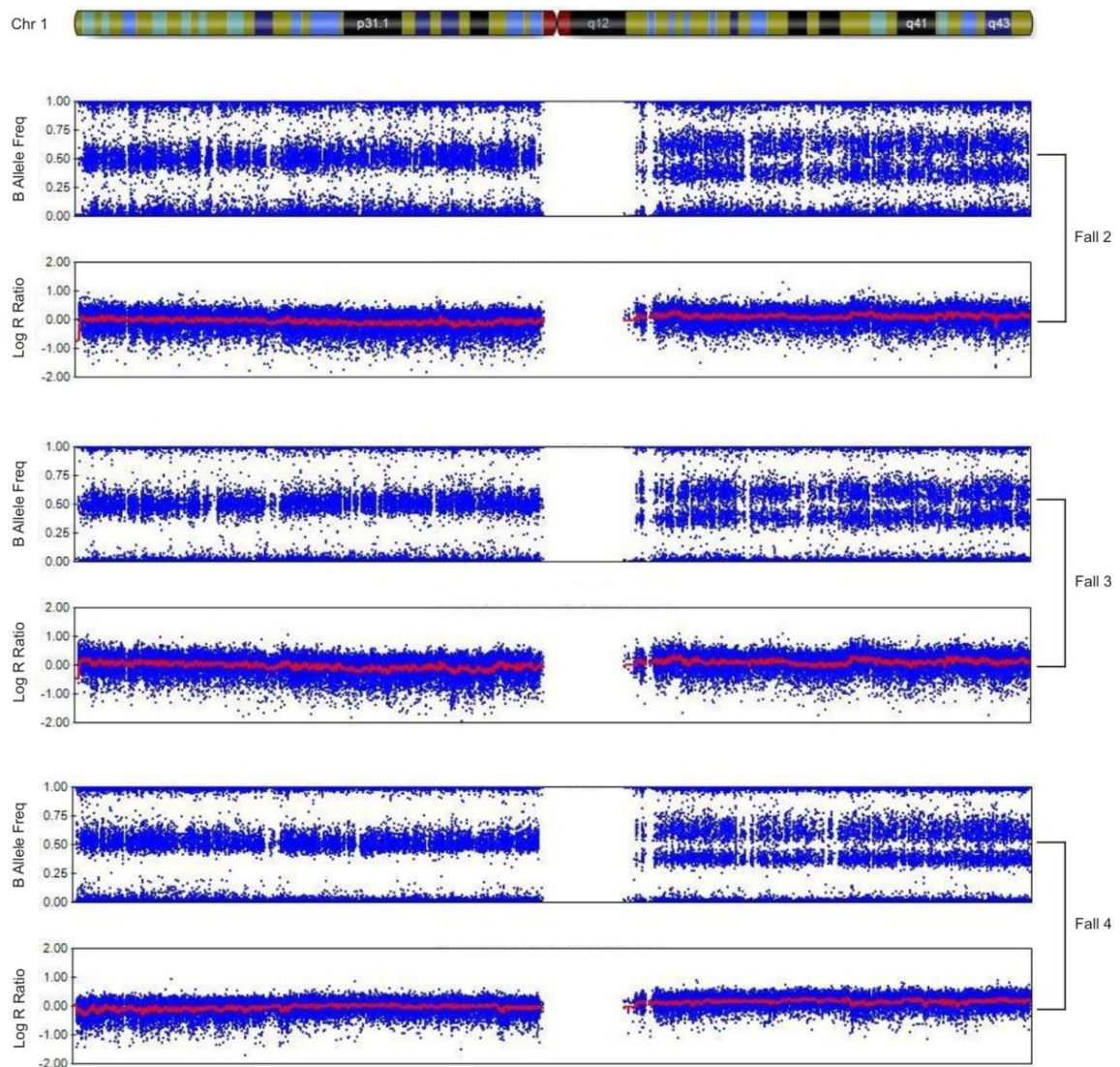


Abb. 12: Rekurrenter Zugewinn des gesamten q-Arms von Chromosom 1.

Durch die Untersuchung auf größere genomische Aberrationen mittels der Illumina HumanOmniExpress-FFPE BeadChip Technologie konnte ein kompletter Zugewinn des q-Arms von Chromosom 1 in drei primären kardialen Angiosarkomen detektiert werden. Die Genomplots für die B-Allelfrequenz und Log R Ratio wurden mit Hilfe der GenomeStudio Software von Illumina generiert.

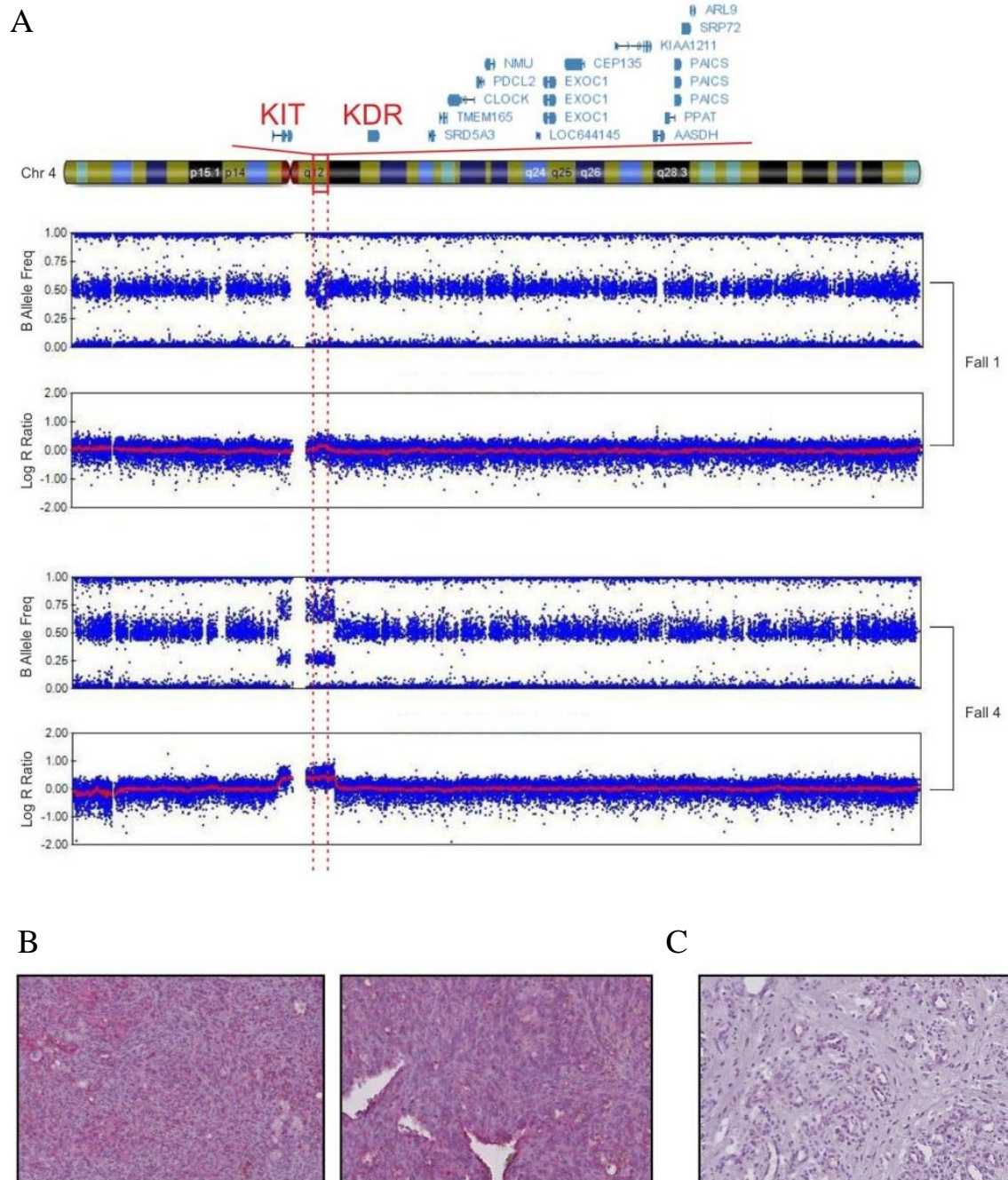


Abb. 13: Der rekurrente Zugewinn auf Chromosom 4 betrifft KIT und KDR.

(A) Durch die Untersuchung größerer genomischer Aberrationen mittels der Illumina HumanOmniExpress-FFPE BeadChip Technologie konnte ein kleiner rekurrenter Zugewinn (hervorgehoben durch die rote, gestrichelte Linie) in 2 primären kardialen Angiosarkomen identifiziert werden. Dieser umfasst einen Bereich von 2 Mb (rotes Rechteck), indem sich u.a. Gene für zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen, KIT und KDR, befinden.

(B, C) Die Expression von KDR wurde durch immunhistologische Färbungen untersucht. Beide Fälle mit dem kleinen Zugewinn auf dem q-Arm von Chromosom 4 und einer starken Expression von KDR sind in B abgebildet. Eine schwache Expression ist an einem Beispiel in Abb. 13 C dargestellt.

Bei der Auswertung der SNP-Array Daten der kardialen Sarkome NOS und des Rhabdomyosarkoms wurde deutlich, dass diese viel komplexere Aberrationen als die kardialen Angiosarkome aufwiesen, was in Abb. 14 exemplarisch an zwei Chromosomen dargestellt ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollten vor allem die kardialen Angiosarkome analysiert werden, weswegen an dieser Stelle auf eine detaillierte Auswertung verzichtet wurde und lediglich die Anzahl aberranter Chromosomen ermittelt wurde. Dabei konnten bei den Sarkomen NOS und dem Rhabdomyosarkom durchschnittlich 17 Chromosomen mit Aberrationen detektiert werden, während bei den Angiosarkomen durchschnittlich 8 aberrante Chromosomen detektiert wurden.

Zudem wurden die Chromosomenabschnitte, die bei den kardialen Angiosarkomen rekurrente Aberrationen aufwiesen, bei den Sarkomen NOS und dem Rhabdomyosarkom genauer ausgewertet. Aberrationen auf dem Chromosom 1 konnten bei 5 von 7 kardialen Sarkomen detektiert werden, jedoch kein Zugewinn des kompletten q-Arms, da entweder das gesamte Chromosom ($n=1$) oder ein oder mehrere Chromosomenabschnitte des q- und/oder

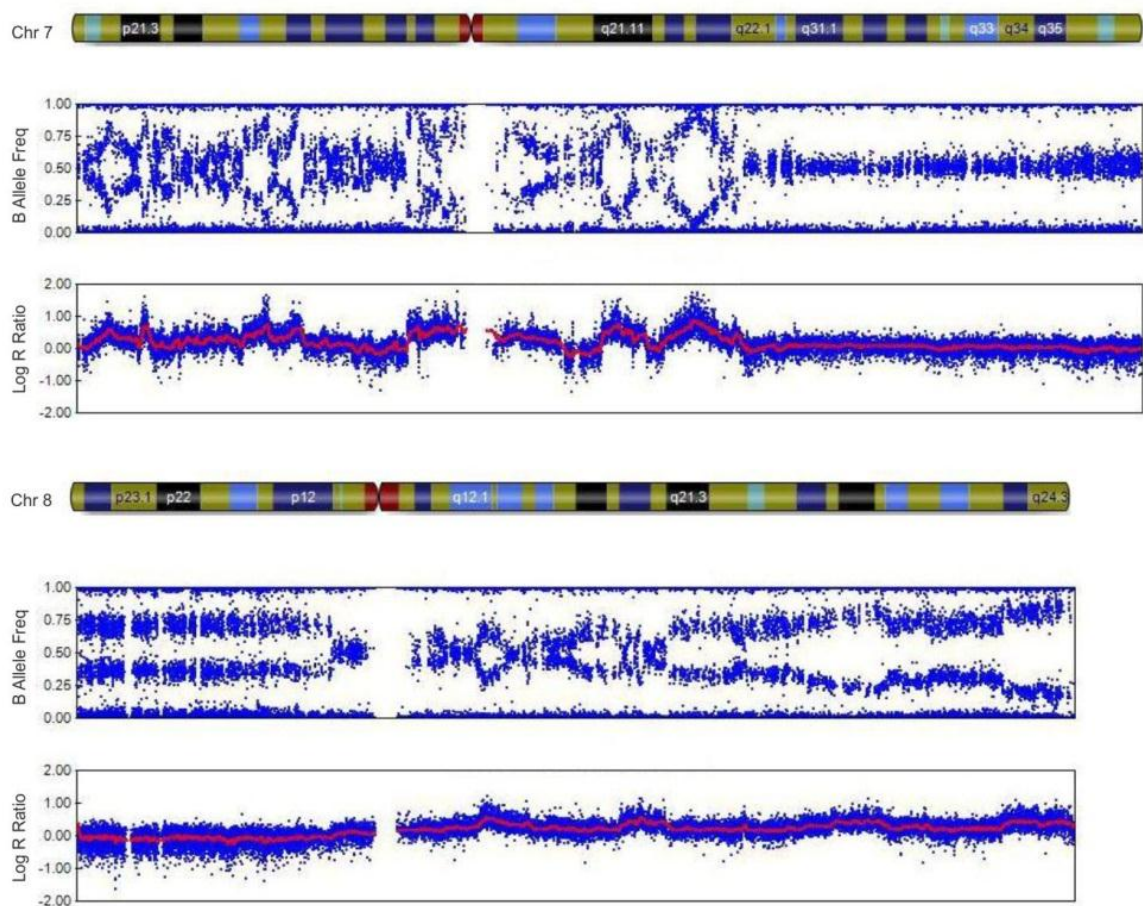


Abb. 14: Die kardialen Sarkome NOS weisen komplexere numerische Aberrationen auf.

Durch die Untersuchung größerer genomischer Aberrationen mittels der Illumina HumanOmniExpress-FFPE BeadChip Technologie konnten bei den kardialen Sarkomen NOS sehr viel komplexere Chromosomenaberrationen im Vergleich zu den kardialen Angiosarkomen identifiziert werden. Als Beispiel sind zwei aberrante Chromosomen (Chromosom 7 und 8) eines kardialen Sarkom NOS dargestellt.

p-Arms Aberrationen aufwiesen (n=4). Aberrationen auf dem Chromosom 4 konnten ebenfalls in 5 von 7 kardialen Sarkomen identifiziert werden. Diese reichten von Veränderungen des gesamten Chromosoms (n=3) bis hin zu einer oder mehrerer Aberrationen auf dem q- und/oder p-Arm (n=2). Bei einem der 6 Sarkome NOS konnte ein Zugewinn auf dem q-Arm des Chromosoms 4, der mit dem 4q-Zugewinn der kardialen Angiosarkome überlappt, identifiziert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Angiosarkome und die Sarkome NOS sowie das Rhabdomyosarkom trotz gleicher Lokalisation in Bezug auf größere chromosomale Veränderungen verschiedene Aberrationen aufweisen und sich somit vermutlich in ihrer Pathogenese unterscheiden.

4.2 miRNA Expressionsanalysen

MicroRNAs (miRNAs) sind kurze, nicht codierende RNAs (20-24 Nukleotide), die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren. Die Regulation beruht auf dem Gen-Silencing, wobei die miRNAs mit dem RNA induced silencing complex (RISC) interagieren und vor allem an die 3'-untranslatierte Region (UTR), aber auch an die 5'-UTR und die codierende Region der mRNA binden und dadurch die Translation hemmen oder die Degradierung der mRNA vermitteln (58; 59; 60). Derzeit sind mehr als 1400 humane miRNAs bekannt, die für die normale Entwicklung und Differenzierung wichtig sind, aber auch Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von Tumoren haben können (58).

Zur genomweiten Untersuchung differentiell exprimierter miRNAs wurden die kardialen Angiosarkome sowie die Sarkome NOS und das Rhabdomyosarkom mittels TaqMan Low Density Assay (TLDA) untersucht (siehe 3.4). Mit diesem Assay konnte durch eine TaqMan-basierte *real time* PCR die Expression von 377 verschiedenen miRNAs gleichzeitig quantifiziert werden (siehe Anhang: Abb. 29). Die RNA-Proben der Angiosarkome (n=9), der Sarkome NOS (n=6) und des Rhabdomyosarkoms wurden zu Beginn auf ihre Qualität getestet, indem eine TaqMan-basierte *real-time* PCR für die nukleoläre Ribonukleinsäure RNU48 durchgeführt wurde (siehe 3.4.1). RNU48 wird aufgrund ihrer stabilen Expression im humanen Genom von Life Technologies als endogene Kontrolle empfohlen. Bei den Angiosarkomen wurden zwei und bei den Sarkomen NOS eine RNA-Probe mit einem Ct-Wert ≥ 25 detektiert. Da schon bei dieser endogenen Kontrolle ein hoher Ct-Wert gemessen wurde, war zu erwarten, dass schwach exprimierte miRNAs im TLDA kaum zu detektieren wären, weswegen nur die RNA-Proben mit einem RNU48-Ct-Wert ≤ 25 weiter analysiert wurden.

Für alle TLDA-Läufe wurden die *Baseline* und der *Threshold* gleich gesetzt und die Ct-Werte auf eine endogene Positivkontrolle normalisiert. Die snRNA U6 wurde auf der TLDA-Platte 4-mal gemessen, weswegen der gemittelte Ct-Wert der snRNA U6 zur Normalisierung verwendet wurde (siehe 3.4.3).

Da Endothelien aus kardialen Gefäßen als Referenz nicht zur Verfügung standen und um dennoch potentiell differentiell exprimierte miRNAs, die bei der Pathogenese der kardialen Angiosarkome eine Rolle spielen könnten, zu ermitteln, wurden die miRNA Expressionsdaten der Angiosarkome mit denen der Sarkome NOS (einschließlich des Rhabdomyosarkoms) verglichen. Im Nachfolgenden und in Bezug auf die miRNA Expressionsanalysen schließt die Bezeichnung Sarkome NOS das Rhabdomyosarkom mit ein. Für die Auswertung der miRNA Expressionsanalyse wurde die StatMiner Software verwendet und zunächst eine nicht-überwachte (engl.: *unsupervised*) Clusteranalyse durchgeführt. Dabei wurden die miRNA-Expressionsmuster aller Proben unabhängig von ihrer Sarkomentität auf ihre Ähnlichkeit zueinander untersucht. Die nicht-überwachte Clusteranalyse wurde von der

Software in Form eines Dendrogramms dargestellt (Abb. 15, obere Darstellung), bei dem die einzelnen Proben anhand ihrer Ähnlichkeit sortiert und miteinander verbunden wurden. Die Länge der senkrechten Linien ist ein Maß für die Ähnlichkeit der miRNA Expression. Anhand der Hauptverzweigung wurde deutlich, dass die Angiosarkome und die Sarkome NOS zwei unabhängige Gruppen darstellten. Die kardialen Angiosarkome und Sarkome NOS wiesen jeweils ein spezifisches miRNA-Expressionsmuster auf, weswegen sie als zwei unterschiedliche und vergleichbare Gruppen betrachtet werden konnten.

Für die Identifizierung differentiell exprimierter miRNAs wurde eine überwachte (engl.: *supervised*) Clusteranalyse zwischen den beiden Gruppen (Sarkome NOS vs. Angiosarkome) durchgeführt. Dabei wurde ein sogenanntes Heatmap-Diagramm erstellt, in dem die Expressionslevel der miRNAs farblich dargestellt wurden. Das Farbschema ergab sich aus den ermittelten Ct-Werten der einzelnen miRNAs; niedrige Ct-Wert wurden in Grün und hohe Ct-Werte in Rot dargestellt (Abb. 15 untere Darstellung).

Zur Identifizierung der differentiell exprimierten miRNAs wurde eine statistische Analyse mit den normalisierten und durchschnittlichen Ct-Werten durchgeführt (siehe Anhang: Tab. 6). Dabei wurden die Sarkome NOS als Referenz betrachtet und mit Hilfe der Benjamini-Hochberg FDR-Methode wurden die miRNAs der Angiosarkome identifiziert, die

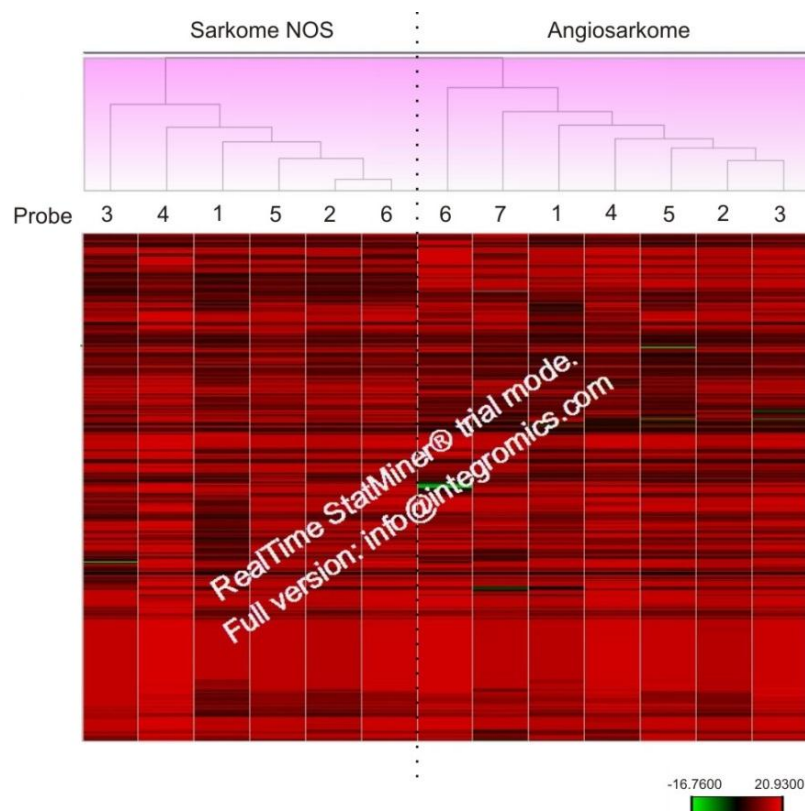


Abb. 15: Hierarchische Clusteranalyse und Heatmap-Darstellung der Angiosarkome und Sarkome NOS.

Durch den Vergleich der miRNA Expressionsmuster aller Proben unabhängig ihrer Sarkomentität wurden die kardialen Angiosarkome und Sarkome NOS durch eine nicht-überwachte Clusteranalyse auf ihre Ähnlichkeit zueinander untersucht (oberer Teil der Abbildung). Die beiden Gruppen sind durch eine gestrichelte Linie voneinander zu unterscheiden. Im unteren Teil der Abbildung sind die zuvor Normalisierten Ct-Werte der 377 untersuchten miRNAs farblich dargestellt (y-Achse; nicht detailliert), wobei niedrige Ct-Werte grün und hohe Ct-Werte rot gekennzeichnet sind. Für die Expressionsanalyse wurde eine Test-Version der StatMiner Software verwendet.

ein signifikant verändertes Expressionsmuster im Vergleich zu den Sarkomen NOS aufwiesen ($p \leq 0,05$). Durch diese Analyse konnten 34 differentiell exprimierte miRNAs identifiziert werden, wobei 21 miRNAs eine erhöhte und 13 miRNAs eine reduzierte Expression aufwiesen (Tab. 2). Beim Vergleich des Veränderungsfaktors (*Fold Change*), konnte die miR-146b-5p als die am stärksten erhöhte (*Fold Change* von 229) und die miR-450b-5p als die am stärksten reduzierte (*Fold Change* von 920) miRNA identifiziert werden.

Tab. 2: Differentiell exprimierte miRNAs in kardialen Angiosarkomen im Vergleich zu kardialen Sarkomen NOS.

Die am stärksten differentiell exprimierten miRNAs sind durch eine hervorgehobene Schrift dargestellt. FDR: *false discovery rate*.

Expression	miRNA	p-Wert (FDR-Methode)	<i>Fold Change</i>
erhöht	miR-19b	0.0227	3.55
	miR-19a	0.02	4.27
	miR-17	0.0126	4.57
	miR-503	0.05	4.79
	miR-130a	0.0318	4.9
	miR-28-3p	0.02	5.37
	miR-331-3p	0.00629	6.61
	let-7f	0.00087	9.55
	mir-139-5p	0.0177	9.55
	miR-20b	0.0284	9.55
	miR-18a	0.00234	10.96
	miR-126	0.00125	12.59
	miR-532-5p	0.00923	12.88
	miR-9	0.0257	14.79
	miR-486-5p	0.00784	15.48
	miR-10b	0.0165	15.49
	miR-330-3p	0.011	21.88
	miR-451	0.011	21.88
	miR-362-5p	0.00234	31.62
	miR-372	0.0179	38.9
	miR-146b-5p	0.000456	229.09
reduziert	miR-28-5p	0.0204	6.92
	miR-362-3p	0.0328	8.32
	miR-628-5p	0.00115	21.88
	miR-29a	0.000761	22.39
	miR-517b	0.0000192	41.69
	miR-627	0.0000192	67.61
	miR-146b-3p	0.0318	95.5
	miR-137	0.000178	114.82
	miR-339-5p	0.0000117	177.83
	miR-519a	0.000304	331.13
	miR-522	0.00000588	436.52
	miR-542-5p	0.00000204	478.63
	miR-450b-5p	0.0000192	912

4.3 Next Generation Sequencing

Da die Pathogenese der primären kardialen Angiosarkome weitgehend unbekannt ist und Mutationsanalysen bisher nur an einzelnen Genen durchgeführt wurden, wurden die Patientenproben auf Punktmutationen sowie kleinere Insertionen und Deletionen (Indels) hin untersucht. Die Angiosarkome sind sehr selten, weswegen kaum Zugriff auf Frischgewebe besteht, daher musste für die Analyse Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material verwendet werden. Dabei war zu beachten, dass die DNA durch die Formalin-Fixierung degradiert ist und nur kurze Fragmente amplifiziert werden können, weswegen eine *whole-exome* Sequenzierung mit diesen Proben nicht durchgeführt werden konnte. Daher wurde das *targeted* NGS (tNGS) angewendet, bei dem zunächst mit 16.000 Primerpaaren des Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel eine Multiplex-PCR durchgeführt wurde (siehe 3.5). Dabei wurden 100-200 bp lange Amplifikate generiert, welche bekannte Mutations-Hotspots (häufig mutierte Genabschnitte) in 409 häufig mutierten Tumorsuppressor- und Onkogenen abdecken (siehe Anhang: Tab. 5). Damit konnten 50% der Gene untersucht werden, die bei dem *Wellcome Trust Sanger Institute Cancer Gene Census* als häufig mutierte Gene in Tumoren identifiziert wurden (70).

Sechs primäre kardiale Angiosarkome, von denen auch tumorfreie DNA gewonnen werden konnte, wurden mit Hilfe des tNGS analysiert. Dadurch konnte bei der Auswertung zwischen den individuellen SNPs und den Tumor-spezifischen Varianten unterschieden werden. Für jeden Fall konnten durchschnittlich $5,4 \cdot 10^6$ *reads* (Anzahl der sequenzierten DNA-Fragmente) und durchschnittlich 508 Mb Sequenz generiert werden. Dabei wurde jede Base durchschnittlich 298-mal sequenziert bzw. abgedeckt. Für die Auswertung sollte jede einzelne Position (Base) mindestens 20-mal abgedeckt sein, was für durchschnittlich 92% der Positionen erreicht werden konnte. Eine Übersicht der generierten Sequenz-Daten ist für jeden Fall im Anhang zusammengefasst (siehe Anhang: Tab. 7).

4.3.1 Auswertung mittels Variant Caller

Die sequenzierten DNA-Fragmente wurden durch das Torrent Variant Caller Plugin zunächst mit einer Referenz abgeglichen (siehe 3.5.4). Als Referenz diente die genomische Sequenz für Homo Sapiens (hg19). Die spezifischen Ziel-Regionen des Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panel wurden als Vergleich verwendet, wodurch veränderte Basen detektiert und in Form einer Excel-Tabelle zusammengestellt wurden. In dieser Liste wurden alle Varianten aufgelistet, die nicht mit der Referenz übereinstimmten, wodurch neben den SNVs, Insertionen und Deletionen auch SNPs detektiert wurden. Um die SNPs herauszufiltern, wurden die Variant Caller-Daten des Tumors mit denen des tumorfreien Gewebes abgeglichen. Varianten, die nur

im Tumorgewebe und mit einer Frequenz von mindestens 10% zu finden waren, wurden mit dem *Integrative Genomic Viewers* (IGV, Broad Institute) analysiert (siehe 3.5.4). In den 6 untersuchten Proben konnten insgesamt 154 somatische Varianten detektiert werden (siehe Anhang: Tab. 8), bei denen es sich um 134 SNVs und 20 Indels handelte. Durchschnittlich konnten 26 Varianten pro Fall detektiert werden.

Bei der Analyse mit dem IGV wurden 133 der 154 Varianten in Introns oder untranslatierten Regionen bzw. als stille Mutationen identifiziert. Die restlichen 21 Varianten befanden sich in codierenden Regionen und wurden mittels PCR und konventioneller Sanger-Sequenzierung überprüft. Dabei wurden 15 der 21 Varianten als missense- oder nonsense-Mutationen bestätigt, welche im Anhang ausführlich zusammengefasst sind (Anhang: Tab. 9). Die 6 falsch-positiven Varianten wurden insgesamt bei 2 der 6 untersuchten kardialen Angiosarkome gefunden. In allen untersuchten Fällen wurden ähnlich viele *reads* beim Sequenzierungsvorgang erreicht (siehe Anhang: Tab. 7), sodass diese Fehler nicht auf eine schlechte Abdeckung der DNA-Fragmente und somit auf eine geringere Sensitivität zurückzuführen sind. Bei der Überprüfung der durch den Variant Caller identifizierten Varianten in codierenden Regionen ergab sich somit eine Fehlerrate von etwa 29%. Daher ist auch bei den 133 Varianten, die durch den Variant Caller in Introns und untranslatierten Regionen oder als stille Mutation identifiziert wurden, von falsch-positiven Varianten auszugehen. Da das Augenmerk dieser tNGS-Analyse aber auf Mutationen in den codierenden Regionen der 409 untersuchten Gene lag, wurden diese Varianten nicht verifiziert und nicht weiter analysiert.

Die 15 bestätigten missense- und nonsense-Mutationen waren vor allem durch C>T (47%) und C>A Substitutionen (40%), aber auch G>A Substitutionen (13%) gekennzeichnet. Bei 6 der 15 Mutationen konnte eine C>T Substitution am CpG-Dinukleotid nachgewiesen werden, an dem häufig diese Punktmutationen entstehen. Dies liegt daran, dass das Cytosin in CpG-Dinukleotiden häufig methyliert wird und eine anschließende Desaminierung zu einem Thymin führen kann (71).

4.3.2 Identifikation rekurrenter Mutationen in *PLCG1*, *KDR* und *MLL2*

Die 15 verifizierten missense- bzw. nonsense-Mutationen betrafen 11 Gene: *PLCG1*, *ERBB4*, *FGFR1*, *NRAS*, *KDR*, *RAF1*, *MLL2*, *ASXL1*, *DCC*, *LRP1B* und *POT1* (Tab. 3). Die 4 primären kardialen Angiosarkome, von denen kein tumorfreies Gewebe zur Verfügung stand, wurden mittels PCR und konventioneller Sequenzierung auf diese 15 Mutationen hin untersucht. Dabei wurde eine weitere Mutation in *PLCG1* detektiert. Die Mehrheit der mutierten Gene konnte anhand ihrer biologischen Funktion in 2 Gruppen unterteilt werden: Signaltransduktion und Chromatinmodifikation (Tab. 3).

Tab. 3: Missense- und nonsense-Mutationen in 6 primären kardialen Angiosarkomen, die mittels tNGS identifiziert und durch konventionelle Sequenzierung bestätigt wurden.

Gen	Fall					
	1	2	3	4	5	6
Signaltransduktion						
PLCG1	R707Q				R707Q	
ERBB4	P651T					
FGFR1	N546K					
NRAS		Q61K				
KDR			T771K			R720W
RAF1				S257L		
Chromatinmodifikation						
MLL2			Q1613*, R5454*		R4904*	
ASXL1				R417*		
Weitere						
DCC				D1172Q		
LRP1B	Y1568*					
POT1			R432*			

* Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

In allen Fällen konnte mindestens ein mutiertes Gen identifiziert werden, welches an der Signaltransduktion beteiligt ist. Darüber hinaus wurden in 50% der Fälle Mutationen in Genen gefunden, die bei der Chromatinmodifikation eine Rolle spielen. Zudem konnten 3 Gene (*KDR*, *MLL2* und *PLCG1*) identifiziert werden, die in mehreren kardialen Angiosarkomen Mutationen aufwiesen. Mutationen in *KDR* sind bei Angiosarkomen bereits bekannt (24) und wurden in 2 Fällen detektiert: in Fall 6 wurde die *KDR*-Mutation in der extrazellulären Immunglobulin-Domäne (R720W) und in Fall 3 in der Transmembrandomäne (T771K) nachgewiesen. Mutationen in Aminosäure 771 wurden bereits bei anderen Tumorentitäten gezeigt (Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC Release v70), Wellcome Trust Sanger Institute) sowie in Angiosarkomen anderer Primärlokalisation, jedoch wurde die Auswirkung der Mutation auf die Pathogenese nicht näher untersucht (24).

MLL2-Mutationen wurden in 2 Fällen identifiziert, wobei in Fall 3 zwei Mutationen zu finden waren. Alle *MLL2*-Mutationen codierten für ein Stop-Codon (Q1613*, R5454* und R4904*), was sehr wahrscheinlich zur Inaktivierung von *MLL2* führt. Die Doppel-Mutation in Fall 3 könnte ein Hinweis dafür sein, dass beide Allele mutiert sind, was zum kompletten Funktionsverlust von *MLL2* führen würde. In genetischen Studien verschiedener Tumore konnten bereits *loss-of-function* Mutationen im *MLL2*-Gen identifiziert werden, weswegen *MLL2* auch als Tumorsuppressor diskutiert wird (72; 73).

4.4 Funktionelle Untersuchungen zur Auswirkung der PLC γ 1-R707Q-Mutation

Um die Konsequenzen der rekurrenten R707Q (c.2120G>A) Mutation zu untersuchen, sollten die mutierte und die unmutierte PLC γ 1 Variante in HEK293-Zellen sowie in primären endothelialen Zellen (HUVEC) ausgeprägt und der Einfluss auf die Signalwege, auf die Proliferationsrate und Apoptose sowie auf Migration und Invasion untersucht werden (siehe 3.10). Für diese funktionellen Untersuchungen wurde ein PLC γ 1-Expressionsvektor (8,7 kb) verwendet. In diesen Vektor wurde durch eine zielgerichtete Mutagenese-Reaktion (GeneArt site-directed Mutagenesis System) die R707Q-Mutation eingefügt (siehe 3.7).

Die Sequenz des Inserts wurde zunächst mit der PLC γ 1-Referenzsequenz der NCBI-Datenbank und mit Hilfe des CLC Sequence Viewer 6 (CLC bio) verglichen. Dabei wurden zwei fehlerhafte Positionen identifiziert (c.1828A>G, p.I610V und c.2438T>C, p.I813T). Da unklar war, welche Auswirkungen diese falschen Nukleotide auf die Funktion von PLC γ 1 haben, wurden beide Nukleotide zunächst mittels GeneArt site-directed Mutagenesis System in die Referenzsequenz umgewandelt. Nach dieser Umwandlung wurde das Plasmid zum einen als PLC γ 1-Wildtyp (PLC γ 1-WT) für die funktionellen Untersuchungen und zum anderen zur Herstellung der mutierten PLC γ 1 Variante (PLC γ 1-R707Q) mittels der zielgerichteten Mutagenese-Reaktion verwendet. Alle veränderten Positionen wurden mit Hilfe konventioneller Sequenzierung überprüft.

Für die funktionellen Untersuchungen wurden der PLC γ 1-WT und die mutierte Variante durch transiente Transfektion sowohl in HEK293-Zellen als auch in HUVECs überexprimiert. Da der PLC γ 1-Expressionsvektor selbst keinen Marker zur Bestimmung der Transfektionseffizienz besitzt, wurde diese indirekt bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit einem 6,2 kb großen Plasmid transient transfiziert, welches für eGFP codiert (pcDNA3-eGFP). 24 Std. nach der Transfektion wurde die Intensität der grünen Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei wurden Transfektionseffizienzen von 72% (HEK293-Zellen) und 59% (HUVECs) erreicht (Abb. 17).

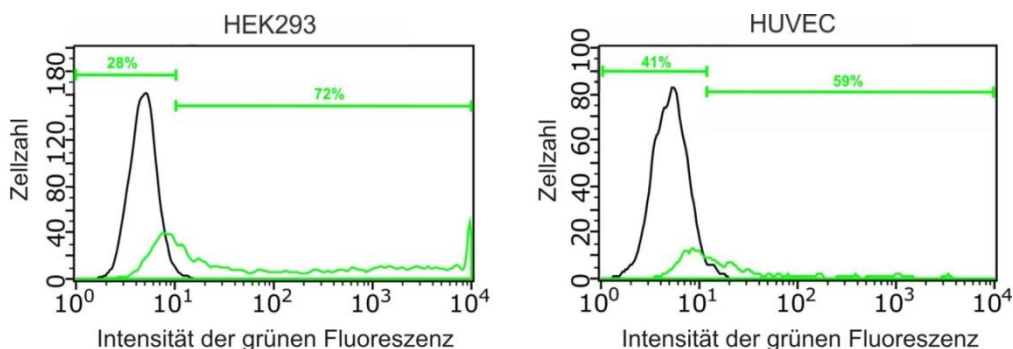


Abb. 17: Bestimmung der Transfektionseffizienz mit dem eGFP Kontroll-Plasmid.

Die Intensität der grünen Fluoreszenz wurde 24 Std. nach der Transfektion eines 6,2 kb großen eGFP-Plasmids mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Untransfizierte Zellen dienten als Kontrolle und sind in schwarz dargestellt. Die transfizierten Zellen sind in grün dargestellt.

4.4.1 Die R707Q-Mutation führt zu einer verringerten Phosphorylierung von PLC γ 1

PLC γ 1 befindet sich normalerweise in einem inaktiven Zustand, indem die cSH2-Domäne die katalytische Domäne durch intramolekulare Interaktion blockiert. Nach einer Liganden-induzierten Aktivierung und Autophosphorylierung einer RTK, wie beispielsweise KDR, bindet PLC γ 1 über die nSH2-Domäne an die phosphorylierte RTK. Nach der Bindung an die RTK wird PLC γ 1 an Tyrosin 783 (Y783) phosphoryliert, woraufhin die cSH2-Domäne an das phospho-Y783 (p-Y783) bindet. Durch diese Interaktion kommt es zu einer Konformationsänderung, sodass die cSH2-Domäne das katalytische Zentrum frei gibt und die Autoinhibierung aufgehoben wird (75).

Um den Einfluss der R707Q-Mutation auf die Phosphorylierung und Aktivierung von PLC γ 1 zu untersuchen, wurden HUVECs mit der mutierten (PLC γ 1-R707Q) bzw. unmutierten (PLC γ 1-WT) Variante transient transfiziert. Zunächst wurde die PLC γ 1-Expression mit den untransfizierten Zellen verglichen. 24 Std. nach der Transfektion konnte eine starke PLC γ 1-Expression beider Varianten durch Western Blot Analysen gezeigt werden (Abb. 18 A). Der Vergleich zwischen Mutante und WT zeigte eine schwächere Expression in Zellen, die die mutierte Variante exprimierten. Dies wiederholte sich auch in allen weiteren Versuchen, obwohl immer gleiche Plasmidmengen aus verschiedenen Präparationen verwendet wurden.

Um den Phosphorylierungsstatus und somit die Aktivierung von PLC γ 1 in den transfizierten HUVECs zu untersuchen, wurden diese für 24 Std. unter Standardbedingungen mit ECGM kultiviert und ein Teil der Zellen wurde anschließend für 5 Min. mit ECGM2, welches eine höhere Konzentration an Endothel-spezifischen Wachstumsfaktoren enthält, stimuliert. Unter Standardbedingungen konnte bereits eine Phosphorylierung von PLC γ 1-WT an Y783 gezeigt werden. Diese RTK-abhängige Aktivierung erfolgt vermutlich durch ein Grundlevel an Wachstumsfaktoren im ECGM. Beim Vergleich mit der mutierten PLC γ 1-Variante wurde deutlich, dass PLC γ 1-R707Q an Y783 im Gegensatz zum PLC γ 1-WT unter Standardbedingungen weniger stark phosphoryliert ist (Abb. 18 A). Durch die Erhöhung der Konzentration an Wachstumsfaktoren im Medium nahm die Phosphorylierung des PLC γ 1-WT um 60% zu, während die Phosphorylierung der mutierten Form um 17% zunahm (Abb. 18 A und B).

Die stark reduzierte Phosphorylierung von PLC γ 1-R707Q an Y783 könnte auf eine Konformationsänderung, hervorgerufen durch die R707Q-Mutation, zurückzuführen sein. Diese könnte bewirken, dass Y783 schlechter zugänglich für die Phosphorylierung durch RTKs ist, oder dass die cSH2-Domäne nicht mehr an p-Y783 bindet, wodurch p-Y783 nicht mehr vor endogenen Phosphatasen geschützt wird und dadurch schneller dephosphoryliert wird. Um diese Hypothesen zu prüfen, wurden die HUVECs 24 Std. nach der Transfektion für 1 Std. mit dem Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitor Pervanadat (100 μ M) behandelt. Anschließend

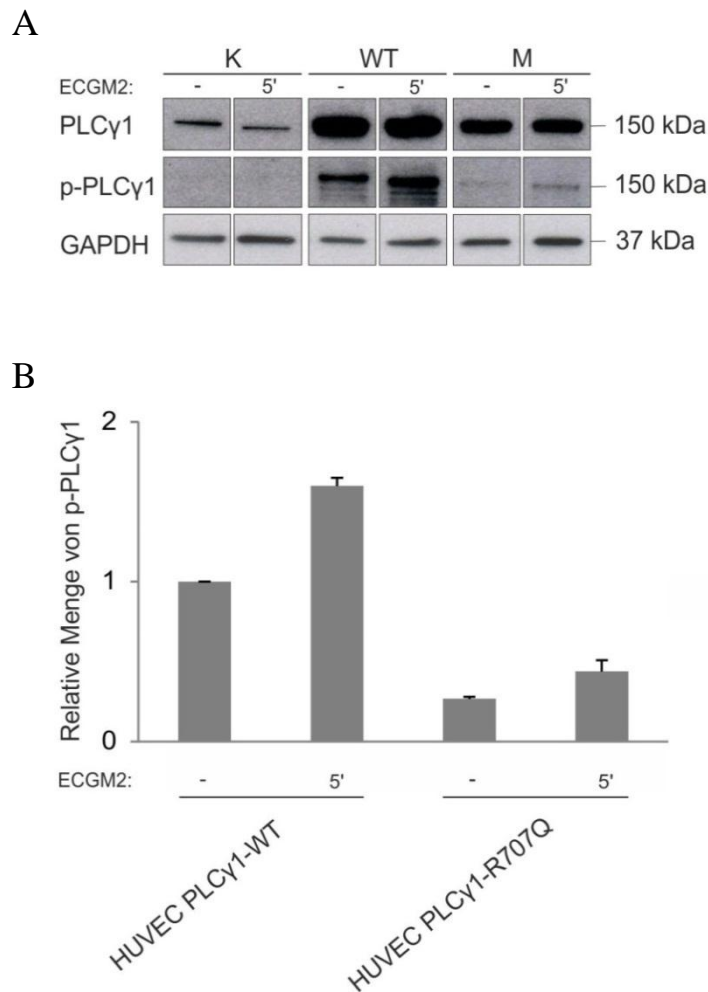


Abb. 18: Die PLCγ1-R707Q Mutation bewirkt eine geringere Phosphorylierung von Y783.

HUVECs wurden transient mit PLCγ1-R707Q bzw. PLCγ1-WT transfiziert und für 24 Std. unter Standardbedingungen mit ECGM kultiviert. Ein Teil der transfizierten Zellen wurde für 5 Min. mit ECGM2, welches höhere Konzentrationen an Wachstumsfaktoren enthält, stimuliert. Als Kontrolle dienten untransfizierte HUVECs.

(A) Das Expressionslevel von PLCγ1 und die Phosphorylierung an Y783 wurden mittels Western Blot analysiert. GAPDH diente als Ladekontrolle. K: Kontrolle (untransfizierte HUVECs), WT: PLCγ1-WT, M: PLCγ1-R707Q.

(B) Darstellung der relativen p-PLCγ1-Menge in Bezug auf den WT ohne ECGM2 Stimulation. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit der ImageJ-Software. Die Normalisierung der p-PLCγ1-Menge bezog sich dabei auf die Gesamt-Proteinmenge von PLCγ1. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten einschließlich der Standardabweichung in Form von Fehlerbalken.

Western-Blot Analysen zeigten sowohl beim PLCγ1-WT als auch bei der mutierten Variante im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine stärkere Phosphorylierung an Y783 (Abb. 19).

Die Ergebnisse zeigten, dass PLCγ1-R707Q durch RTKs prinzipiell phosphoryliert werden kann, ohne Phosphatase-Inhibierung aber eine viel geringere Phosphorylierung im Vergleich zu PLCγ1-WT aufweist. Dies könnte möglicherweise an einer durch die R707Q-Mutation verursachten Konformationsänderung liegen, durch die p-Y783 nicht mehr mit der cSH2-Domäne interagiert, dadurch nicht mehr vor Phosphatasen geschützt wird und somit verstärkt dephosphoryliert wird.

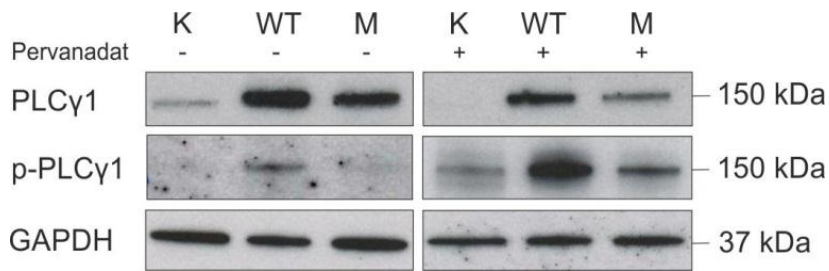


Abb. 19: PLCγ1-R707Q wird an Y783 stärker dephosphoryliert als der WT.

Um zu untersuchen, ob die verringerte Phosphorylierung von PLCγ1-R707Q an Y783 auf eine verstärkte Dephosphorylierung zurückzuführen ist, wurden die HUVECs 24 Std. nach der Transfektion für eine Stunde mit 100 µM des Protein-Tyrosin-Phosphatase-Inhibitors Pervanadat behandelt. Zur Ermittlung des Phosphorylierungslevels wurden Western Blot Analysen durchgeführt. GAPDH diente als Ladekontrolle. K: Kontrolle (untransfizierte HUVECs), WT: PLCγ1-WT, M: PLCγ1-R707Q.

4.4.2 Die R707Q-Mutation aktiviert PLCγ1

Die Interaktion der autoinhibitorischen cSH2-Domäne mit p-Y783 und die daraus resultierende Konformationsänderung sind für die Aktivierung der Phospholipase essentiell. In 4.4.1 konnte gezeigt werden, dass PLCγ1-R707Q an Y783 stärker dephosphoryliert wird als der WT. Um zu untersuchen, ob die mutierte Variante dennoch zu einer Aktivierung der Phospholipase führt, wurden die Signalwege, die durch PLCγ1 aktiviert werden, analysiert.

Ist PLCγ1 aktiv, spaltet es Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂), welches als Phospholipid-Komponente ein Bestandteil der Zellmembran ist. Durch die Hydrolyse von PIP₂ entstehen zwei wichtige *second messenger*: 1,2-Diacylglycerin (DAG) und Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP₃). DAG aktiviert über PKCα den RAF/MEK/ERK-Signalweg. IP₃ erhöht die Ca²⁺-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum, wodurch Ca²⁺-abhängige Enzyme, wie die Serin/Threonin Phosphatase Calcineurin, welche u.a. den Transkriptionsfaktor NFAT in endothelialen Zellen dephosphoryliert, aktiviert werden (76; 77; 78).

Zur Untersuchung der Aktivierung des RAF/MEK/ERK-Signalweges wurden HEK293-Zellen und HUVECs mit beiden PLCγ1-Varianten transient transfiziert und mittels Western Blot analysiert. Die Expression der PLCγ1-R707Q Mutante bewirkte trotz stärkerer Dephosphorylierung an Y783 sowohl in den HUVECs als auch in den HEK293-Zellen eine deutlich stärkere Phosphorylierung und somit eine erhöhte Aktivierung von c-Raf, MEK und ERK1/2 im Vergleich zum PLCγ1-WT (Abb. 20 A). Dabei konnte in mindestens 3 unabhängigen Versuchen eine mehr als 4-mal stärkere Phosphorylierung von c-Raf und MEK und eine fast 3-mal stärkere Phosphorylierung von ERK1/2 in den HEK293-Zellen, die die mutierte Variante exprimierten, detektiert werden (Abb. 20 B).

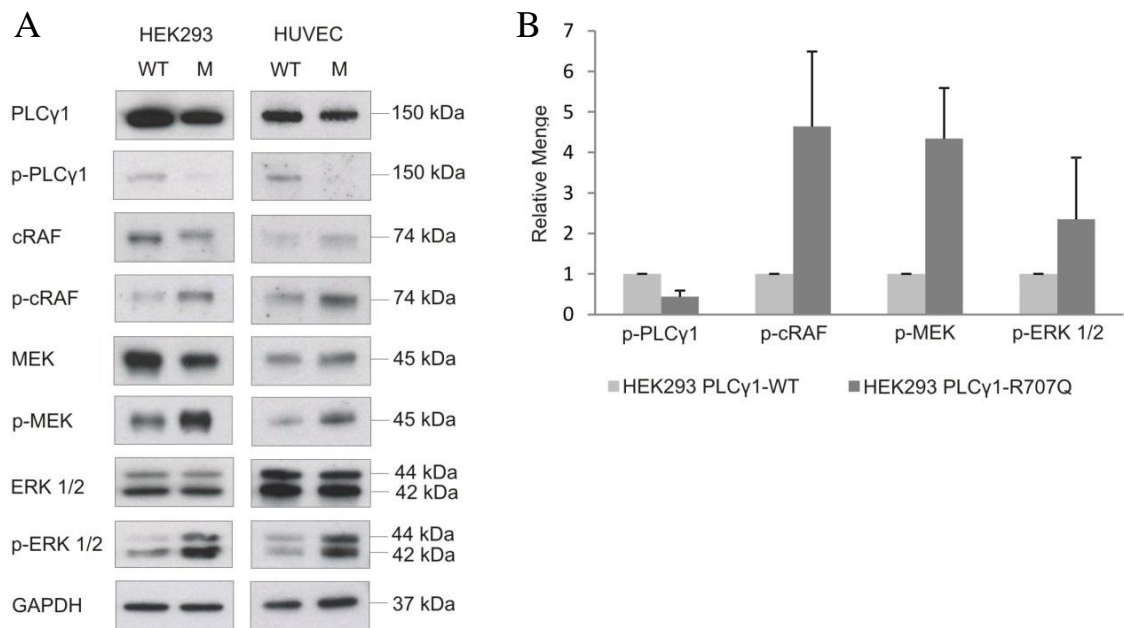


Abb. 20: Die PLCγ1-R707Q-Mutation führt zur Aktivierung des RAS/MEK/ERK-Signalweges.

Um den Effekt der R707Q-Mutation auf die intrazellulären Signalwege zu untersuchen, wurde die mutierte (PLCγ1-R707Q) und unmutierte (PLCγ1-WT) PLCγ1-Variante transient in HUVECs und HEK293-Zellen exprimiert.

(A) Western Blot Analysen mit den Zelllysaten wurden 24 Std. nach der Transfektion durchgeführt, um neben der ektopischen Expression von PLCγ1 sowie der Phosphorylierung an Y783 auch die Phosphorylierung des RAS/MEK/ERK-Signalweges zu untersuchen. GAPDH diente als Ladekontrolle. WT = PLCγ1-WT, M = PLCγ1-R707Q

(B) Darstellung der relativen Mengen von p-PLCγ1, p-cRAF, p-MEK sowie p-ERK1/2 in den PLCγ1-R707Q transfizierten HEK293-Zellen. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit der ImageJ-Software. Die Normalisierung der phosphorylierten Proteinmengen bezog sich dabei auf die Gesamt-Proteinmenge von PLCγ1. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten einschließlich der Standardabweichungen in Form von Fehlerbalken.

Um die Auswirkung der R707Q-Mutation auf den IP3-Signalweg zu untersuchen, wurden die transfizierten HEK293-Zellen mittels IP-One ELISA untersucht. Durch die Expression der PLCγ1-R707Q Mutante in den HEK293-Zellen konnte im Vergleich zum PLCγ1-WT fast doppelt so viel IP1, ein Abbauprodukt von IP3, mit dem IP-One ELISA detektiert werden (Abb. 21 A). Der IP-One ELISA ließ sich nur mit HEK293-Zellen durchführen, da HUVECs mit dem für den IP-One ELISA notwendigen Lyse-Schritt nicht kompatibel waren. Um die Aktivierung des IP3-Signalweges durch die R707Q-Mutation auch an den HUVECs zu untersuchen, wurde der Phosphorylierungsstatus des Transkriptionsfaktors NFAT durch Western Blot Analysen ermittelt. NFAT wird durch Calcineurin dephosphoryliert und gelangt daraufhin vom Zytoplasma in den Zellkern, wo NFAT als Transkriptionsfaktor an die DNA bindet (79). In den HUVECs, die die mutierte PLCγ1 Variante ausprägten, war NFAT im Vergleich zum PLCγ1-WT weniger stark phosphoryliert (Abnahme um 32%), was auf eine stärkere Aktivität von NFAT hinweist (Abb. 21 B).

Die Analysen der PLCγ1-spezifischen Signalwege zeigten trotz stärkerer Dephosphorylierung von PLCγ1-R707Q an Y783 eine verstärkte Aktivierung der DAG- und IP3-abhängigen Signalwege sowohl in HEK293-Zellen als auch in HUVECs. Die Ergebnisse

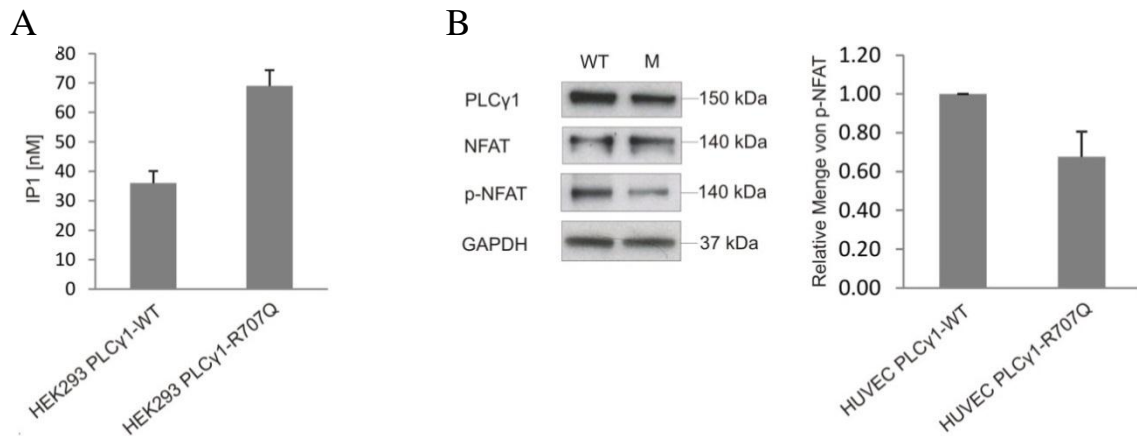


Abb. 21: Die PLCγ1-R707Q-Mutation aktiviert den IP3-Signalweg.

Um den Effekt der R707Q-Mutation auf die intrazellulären Signalwege zu untersuchen, wurde die mutierte (PLCγ1-R707Q) und unmutierte (PLCγ1-WT) PLCγ1-Variante transient in HUVECs und HEK293-Zellen exprimiert.

(A) Die IP3-Menge in den transient transfizierten HEK293-Zellen wurde indirekt über IP1 nachgewiesen. IP1 ist ein Abbauprodukt von IP3 und akkumulierte durch die Verwendung von LiCl in der Zelle. Die Akkumulation ließ sich mit Hilfe des IP-One ELISAs quantifizieren. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit den HEK293-Zellen einschließlich der Standardabweichungen in Form von Fehlerbalken. Die PLCγ1-Expression in den Zellen wurde mittels Western Blot kontrolliert.

(B) Um den Phosphorylierungsstatus von NFAT zu untersuchen, wurden die Lysate der transient transfizierten HUVECs mittels Western Blot analysiert (linke Abbildung). GAPDH diente dabei als Ladekontrolle. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit der ImageJ-Software. Die relativen p-NFAT-Mengen in den HUVECs, die die mutierte Variante exprimierten, wurden aus drei unabhängigen Experimenten kalkuliert und sind in der rechten Abbildung dargestellt. Die Normalisierung der p-NFAT-Menge bezog sich dabei auf die Gesamt-Proteinmenge von PLCγ1, die ebenfalls mittels Western Blot ermittelt wurde.

deuten darauf hin, dass die R707Q Mutation zu einer RTK-unabhängigen und konstitutiven Aktivierung von PLCγ1 führt.

4.4.3 Die R707Q-Mutation begünstigt das Zellüberleben

Es wurde bereits beschrieben, dass die Aktivierung des KDR/PLCγ1-Signalweges die Proliferation endothelialer Zellen beeinflusst (76; 80). Um zu untersuchen, ob die PLCγ1-R707Q-Mutation Auswirkungen auf das Proliferationsverhalten endothelialer Zellen hat, wurden die mutierte und unmutierte PLCγ1 Variante transient in HUVECs exprimiert. Die Zellzahl wurde sowohl 24 Std. als auch 48 Std. nach der Transfektion mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit der Kontrolle (HUVECs transfiziert mit dem eGFP-Plasmid) verglichen. Während der Versuche wurde deutlich, dass das Verhalten primärer Zellen variiert, was durch unterschiedliche Wachstumsraten anhand der Kontrollen beobachtet wurde. Um dies zu berücksichtigen, wurden die relativen Zellzahlen aus drei unabhängigen Experimenten ermittelt (Abb. 22). Allein durch die Expression des PLCγ1-WT konnte im Vergleich zur GFP-Kontrolle eine Zunahme der Zellzahl nach 24 Std. beobachtet werden, was vermutlich auf die Überexpression der Phospholipase und die Liganden-induzierte Aktivierung durch das Grundlevel an Wachstumsfaktoren im ECGM zurückzuführen ist. Nach 48 Std.

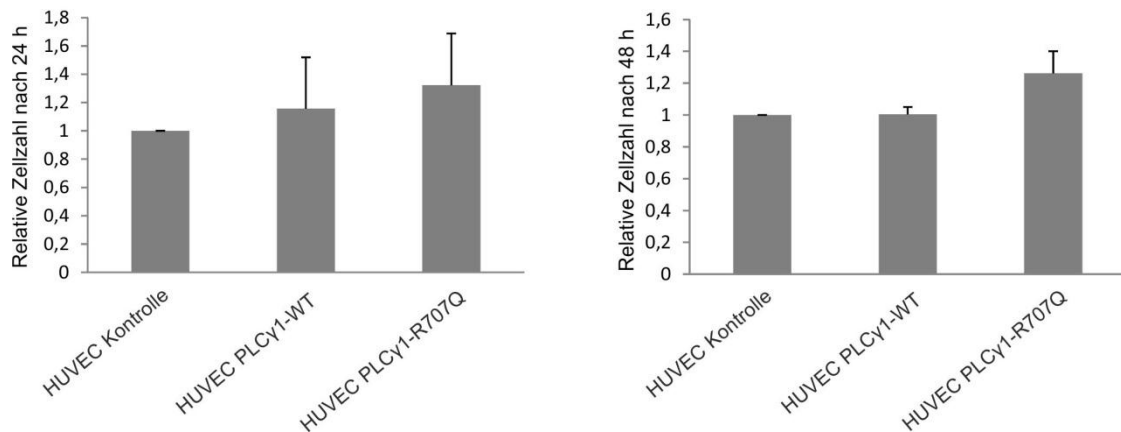


Abb. 22: Die PLCγ1-R707Q-Mutation bewirkt eine geringe Zunahme der Zellzahl im Vergleich zum Wildtyp.

Um die Effekte der R707Q-Mutation auf die Proliferation der HUVECs zu untersuchen, wurden diese mit dem PLCγ1-R707Q- bzw. PLCγ1-WT- Plasmiden transfiziert. Als Kontrolle wurden HUVECs mit dem eGFP-Plasmid transfiziert. Nach 24 und 48 Std. wurde die Anzahl der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die relativen Zellzahlen wurden in Bezug auf die Kontrolle nach 24 Std. (linke Abbildung) und nach 48 Std. (rechte Abbildung) aus jeweils drei unabhängigen Experimenten kalkuliert.

konnte dies nicht beobachtet werden. Allerdings konnte eine geringe Zunahme der Zellzahl bei den HUVECs, die mit dem PLCγ1-R707Q-Plasmid transfiziert wurden, sowohl nach 24 Std. (16%) als auch nach 48 Std. (26%) im Vergleich zum PLCγ1-WT beobachtet werden. Um herauszufinden, ob die erhöhte Zellzahl durch eine verstärkte Proliferationsrate verursacht wird, wurde die Zellzyklusverteilung durch Quantifizierung des zellulären DNA-Gehalts analysiert. Dafür wurden HUVECs mit der unmutierten und mutierten PLCγ1 Variante bzw. als Kontrolle mit dem eGFP-Plasmid transfiziert. 24 und 48 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen mit einem Propidiumiodid (PI)/RNase-Puffer inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Beim Vergleich des Zellanteils in der G1-, S- und G2-Phase konnten zwischen der mutierten und unmutierten PLCγ1 Variante sowohl nach 24 Std. als auch nach 48 Std. keine Unterschiede beobachtet werden (Abb. 23).

Kürzlich veröffentlichte Studien beschrieben eine anti-apoptotische Rolle von PLCγ1 (81; 82; 83), weswegen untersucht wurde, ob die erhöhte Zellzahl auf einen anti-apoptotischen Effekt der PLCγ1-R707Q Variante zurückzuführen ist. Dafür wurden die HUVECs mit dem PLCγ1-R707Q- bzw. mit dem PLCγ1-WT-Plasmid und als Kontrolle mit dem eGFP-Plasmid transfiziert und zum Teil mit dem Apoptose-auslösenden Zytostatikum Cisplatin behandelt. Nach der Färbung mit AnnexinV und PI wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dabei konnten sowohl die intakten, lebenden Zellen (Abb. 24, Quadrant 1) als auch die apoptotischen (Abb. 24, Quadrant 2) und toten Zellfraktionen (Abb. 24, Quadrant 3) voneinander unterschieden werden. Der Vergleich der lebenden Zellfraktionen erfolgte zwischen den PLCγ1-WT und PLCγ1-R707Q transfizierten Zellen. Bei den unbehandelten HUVECs, die die mutierte PLCγ1 Variante exprimierten, konnten 6% (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen) mehr lebende Zellen beobachtet werden als bei PLCγ1-WT (Abb. 25 A). Durch die Behandlung mit Cisplatin wurde dieser Effekt verstärkt, d.h. es wurden

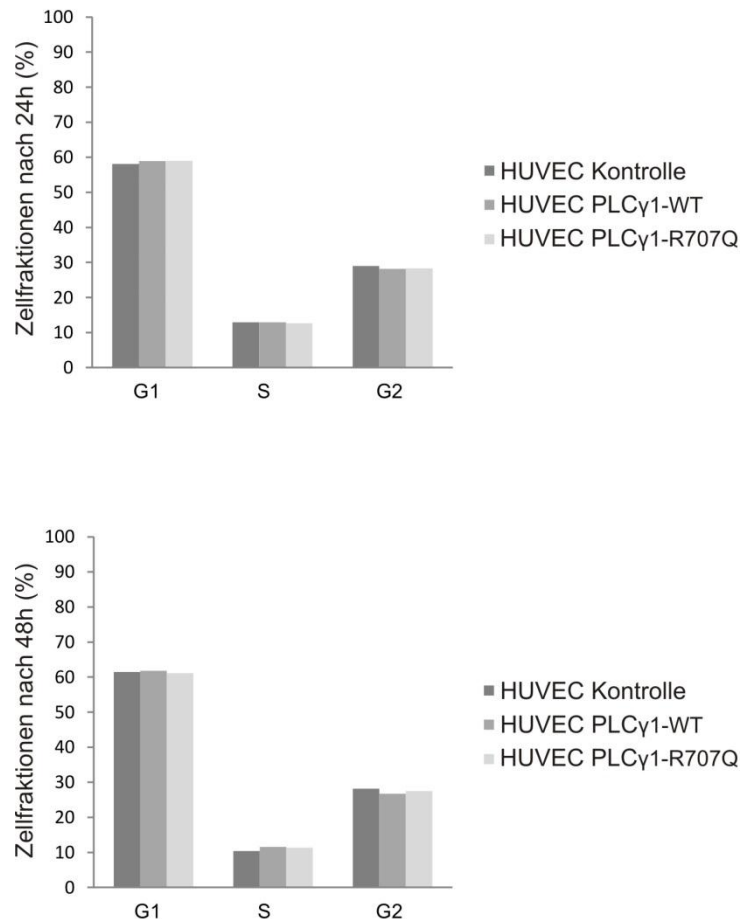


Abb. 23: Die PLCγ1-R707Q-Mutation hat keinen Einfluss auf die Zellzyklusverteilung.

Um den Einfluss der R707Q-Mutation auf die Zellzyklusverteilung zu untersuchen, wurden die Zellen 24 und 48 Std. nach der Transfektion mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle wurden HUVECs mit dem eGFP-Plasmid transfiziert. Die Zellzyklusverteilung wurde durch die Quantifizierung des für die G1-, S- und G2-Phase typischen DNA-Gehalts ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Versuch.

11% (Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen) mehr lebende Zellen im Vergleich zu PLCγ1-WT detektiert (Abb. 25 B).

Neben der Ermittlung der Zellfraktionen durch den Apoptose-Assay wurden die Zellzahlen mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurde der prozentuale Anteil überlebender Zellen nach Cisplatin-Behandlung durch den Vergleich mit unbehandelten Zellen kalkuliert (Abb. 25 C). Auch dabei konnte eine erhöhte Zellzahl (10%) bei den PLCγ1-R707Q transfizierten HUVECs im Vergleich zum PLCγ1-WT beobachtet werden. Beim Vergleich der Anzahl überlebender Zellen wurde deutlich, dass bereits die Expression von PLCγ1-WT im Vergleich zur Kontrolle das Zellüberleben begünstigt. Dies ist vermutlich auf die Überexpression der Phospholipase und die Liganden-induzierte Aktivierung durch das Grundlevel an Wachstumsfaktoren im Medium zurückzuführen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die R707Q-Mutation die Apoptoseresistenz endothelialer Zellen erhöht, aber keinen Einfluss auf die Proliferationsrate hat.

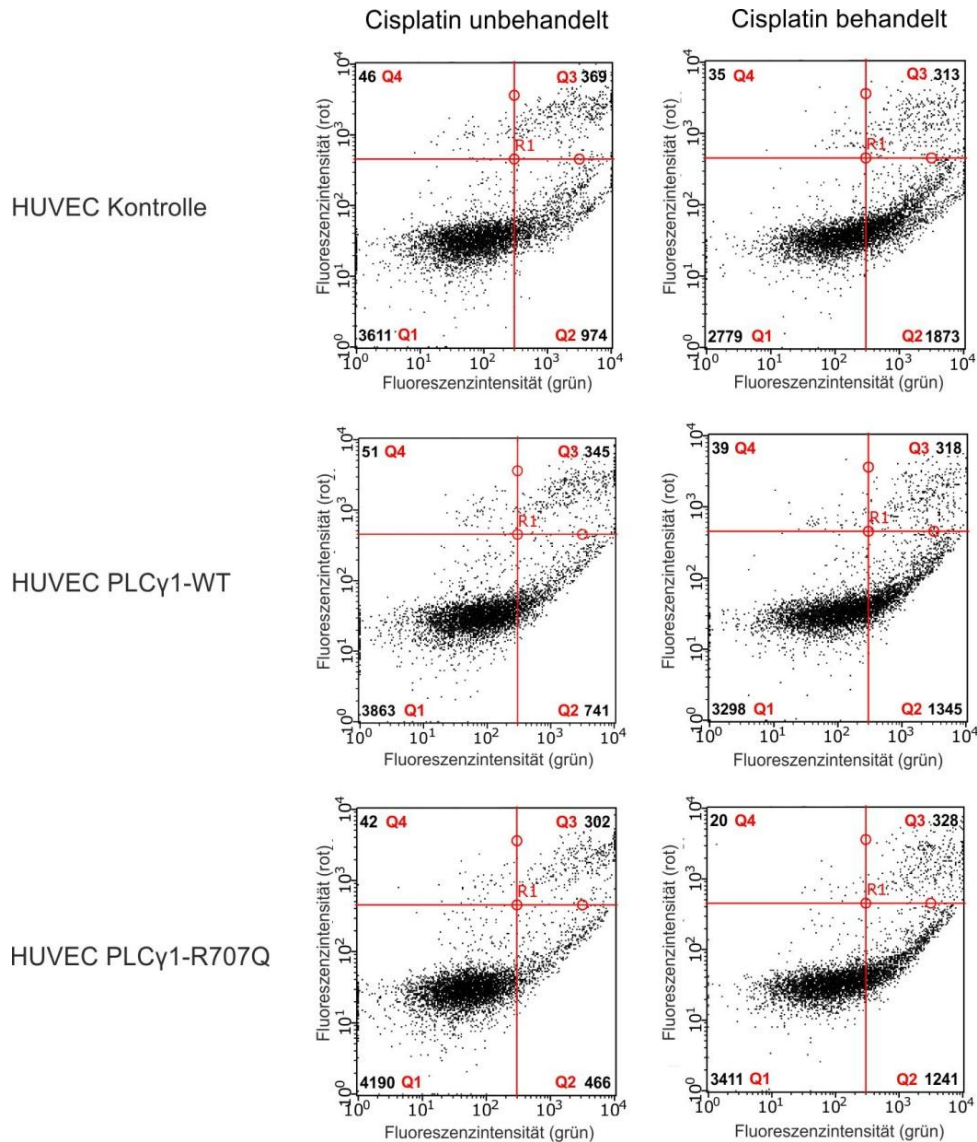


Abb. 24: Durchflusszytometrische Analyse des Apoptose-Assays.

HUVECs wurden mit der mutierten und unmutierten PLC γ 1 Variante sowie als Kontrolle mit dem eGFP-Plasmid transfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurden die Zellen für weitere 24 Std. mit 45 μ M Cisplatin behandelt. Als Vergleich wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Nach der Färbung mit AnnexinV und PI wurden 5000 Zellen mittels Durchflusszytometrie in die einzelnen Zellfraktionen unterteilt. Die intakten Zellen sind im Quadranten 1 (Q1), die apoptotischen Zellen im Quadranten 2 (Q2), die toten Zellen im Quadranten 3 (Q3) und die Zelltrümmer im Quadranten 4 (Q4) dargestellt. Die Zellzahlen sind für jede Fraktion in den entsprechenden Quadranten abzulesen. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und exemplarisch sind die Ergebnisse für einen Versuch dargestellt.

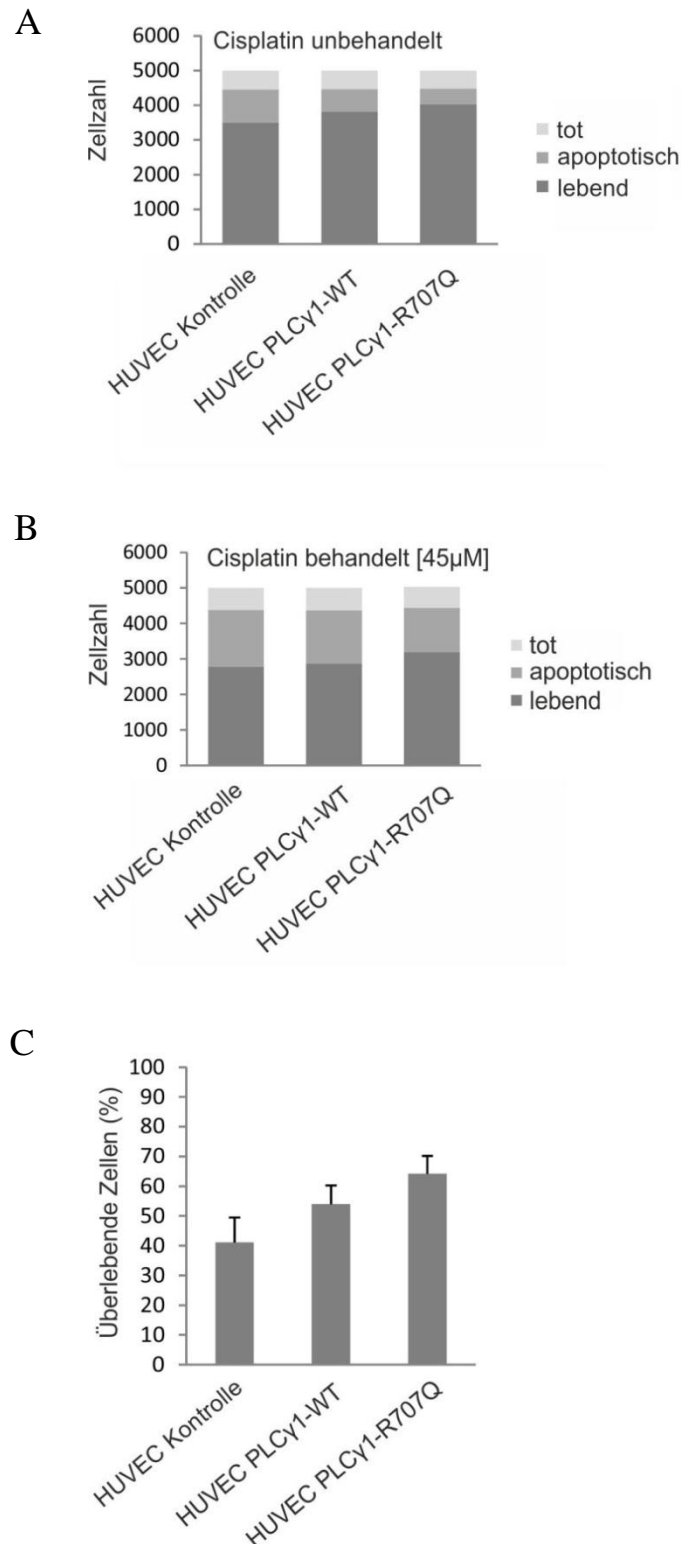


Abb. 25: Die PLCγ1-R707Q-Mutation erhöht die Apoptoseresistenz endothelialer Zellen.

Um zu untersuchen, ob die Zunahme der Zellzahl auf einen anti-apoptotischen Effekt der R707Q-Mutation zurückzuführen ist, wurden der Apoptose-Assay (siehe Abb. 24) dreimal wiederholt und die Daten grafisch dargestellt.

(A, B) Es wurden je 5000 Zellen mittels Durchflusszytometrie entsprechend ihrer Färbung durch AnnexinV und PI in die einzelnen Zellfraktionen (lebend, apoptotisch und tot) unterteilt. Die Mittelwerte aus den drei Versuchen sind in Form von Säulendiagrammen sowohl für die Cisplatin-unbehandelten (A) als auch für die Cisplatin-behandelten (B) Zellen dargestellt.

(C) Parallel zum Apoptose-Assay wurden die Zellzahlen mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dabei wurde der prozentuale Anteil überlebender Zellen nach der Cisplatin-Behandlung durch den Vergleich mit den Cisplatin-unbehandelten Zellen kalkuliert und grafisch dargestellt. Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken dargestellt.

4.4.4 Die R707Q-Mutation fördert die Migration und Invasion endothelialer Zellen

PLC γ 1 ist an der Regulation der Reorganisation des Zytoskeletts sowie an der Migration und Invasion der Zellen beteiligt (84; 85; 86). Deshalb sollte der Effekt der R707Q-Mutation auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit endothelialer Zellen untersucht werden.

Bei der Reorganisation des Zytoskeletts spielt das Aktin-bindende Protein Cofilin eine wichtige Rolle, welches in der aktiven, unphosphorylierten Form zur Remodellierung der Aktinfilamente beiträgt (87; 88). Die Aktivität von Cofilin wird über verschiedene Wege reguliert, beispielsweise durch Dephosphorylierung des im Zytoplasma lokalisierten und an Serin 3 (Ser3) phosphorylierten Cofilins. Es konnte gezeigt werden, dass Calcineurin die Dephosphorylierung durch die Aktivierung der Protein-Phosphatase Slingshot 1 (SSH1) fördert (88). Zudem wird die Menge aktiven Cofilins im Zytoplasma durch die PLC γ 1-vermittelte Hydrolyse von PIP₂, welches aktives (unphosphoryliertes) Cofilin bindet, erhöht (87). Es ist bekannt, dass die PLC γ 1-vermittelte Aktivierung von Cofilin durch Kinasen reguliert wird, die Cofilin am Ser3 phosphorylieren und somit wieder inaktivieren. Dabei spielt vor allem die Lim Kinase-1 (LIMK1) eine wichtige Rolle. Bei der Rezeptor-vermittelten Aktivierung von PLC γ 1 wird auch gleichzeitig der PI3K/Rho/ROCK1-Signalweg aktiviert, welcher wiederum LIMK1 aktiviert. Ist diese Balance gestört, ändert sich das Migrations- und Invasionsverhalten der Zellen (87).

Um den Phosphorylierungsstatus von Cofilin zu untersuchen, wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Dafür wurden HUVECs transient mit dem PLC γ 1-R707Q- bzw. mit dem PLC γ 1-WT-Plasmid transfiziert und nach 24 Std. lysiert. Die Western Blot Analysen zeigten eine um 44% reduzierte Phosphorylierung von Cofilin am Ser3 bei den Zellen, die die mutierte PLC γ 1 Variante exprimierten im Vergleich zum PLC γ 1-WT (Abb. 26). Da es durch

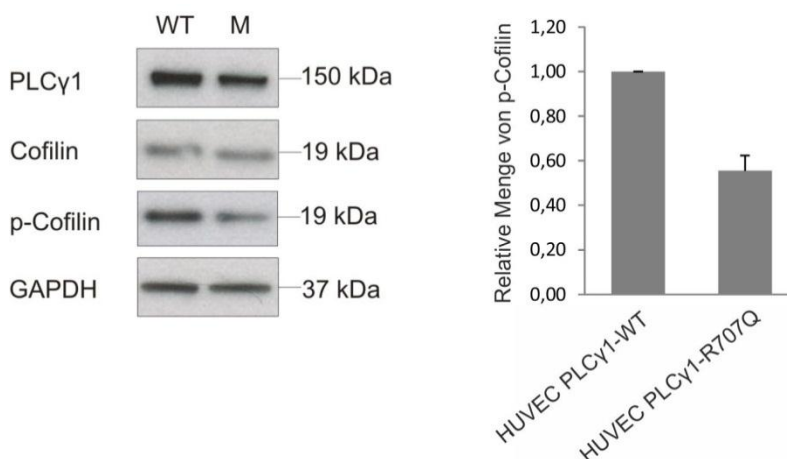


Abb. 26: Die PLC γ 1-R707Q-Mutation bewirkt eine verstärkte Aktivierung von Cofilin.

Um den Einfluss der R707Q-Mutation auf die Aktin-Remodellierung zu untersuchen, wurden HUVECs mit der PLC γ 1-R707Q- bzw. mit dem PLC γ 1-WT-Plasmid transient transfiziert. 24 Std. nach der Transfektion wurde der Phosphorylierungsstatus von Cofilin mittels Western Blot analysiert (linke Abbildung). GAPDH diente dabei als Ladekontrolle. Die Quantifizierung der Proteinbanden erfolgte mit der ImageJ-Software. Die relativen p-Cofilin-Mengen wurden aus drei unabhängigen Experimenten kalkuliert und sind in der rechten Abbildung dargestellt. Die Normalisierung der p-Cofilin-Menge bezog sich dabei auf die Gesamt-Proteinmenge von PLC γ 1, die ebenfalls mittels Western Blot ermittelt wurde.

PLC γ 1-R707Q zu einer Rezeptor-unabhängigen Aktivierung von PLC γ 1 kommt, könnte diese verringerte Phosphorylierung von Cofilin auf die fehlende Aktivierung von LIMK1 zurückzuführen sein.

Um den Einfluss der R707Q-Mutation auf die Migration und Invasion endothelialer Zellen zu untersuchen, wurde ein Zweikammer-Zellkultursystem verwendet (siehe 3.10.3). Für die Analyse der Migration wurden Zellkultureinsätze, bestehend aus einer PET-Membran mit 8 μ m großen Poren, verwendet. Bei dem Invasions-Assay war die PET-Membran mit einer dünnen Matrigelschicht, welche die extrazelluläre Matrix nachbildet, bedeckt. Durch diese Schicht können nur invasive Zellen wandern, da sie Enzyme (bspw. Matrix-Metalloproteinasen) exprimieren, die zur Degradierung und Remodellierung der extrazellulären Matrix beitragen (69). Für den Migrations- und Invasions-Assay wurden transient transfizierten HUVECs in *endothelial cell basal medium* aufgenommen, in die entsprechenden Einsätze ausplattiert und für 24 Std. kultiviert. Dabei diente ECGM in der unteren Medium-Kammer als Chemoattraktant für die Zellen, aufgrund der enthaltenen Endothel-spezifischen Wachstumsfaktoren. Um die optimale Zelldichte für diese Versuche herauszufinden, wurden unterschiedlich viele Zellen ausplattiert ($2,5 \cdot 10^3$, $3 \cdot 10^3$ und $5 \cdot 10^3$), woraus sich insgesamt 7 unabhängige Experimente ergaben. Wie bei den vorherigen Versuchen konnte bereits durch die Überexpression von PLC γ 1-WT ein Effekt beobachtet werden. Sowohl mit dem Migrations- als auch mit dem Invasions-Assay konnten mehr Zellen auf der Unterseite des Zellkultureinsatzes im Vergleich zur GFP-Kontrolle gezählt werden, was den Einfluss von PLC γ 1 auf die Zellmotilität und Invasivität bestätigt. Beim Vergleich zwischen den PLC γ 1-R707Q bzw. PLC γ 1-WT exprimierenden Zellen konnte in allen 7 Versuchen eine verstärkte Migration und in 6 von 7 Versuchen auch eine erhöhte Invasion bei den PLC γ 1-R707Q exprimierenden Zellen beobachtet werden (Tab. 4).

Tab. 4: Die PLC γ 1-R707Q-Mutation erhöht die Migration und Invasion endothelialer Zellen.

Experiment	Anzahl ausplattierter Zellen	Anzahl migrierter Zellen			Anzahl invasiver Zellen		
		Kontrolle	PLC γ 1-WT	PLC γ 1-R707Q	Kontrolle	PLC γ 1-WT	PLC γ 1-R707Q
1	2500	46	168	415	56	89	128
2	3000	225	361	410	97	109	140
3	3000	128	534	560	52	107	81
4	5000	150	558	1041	20	63	320
5	5000	546	1143	1423	92	149	306
6	5000	630	772	986	163	149	158
7	5000	427	386	544	301	306	449

Die Anzahl der migrierten bzw. invasiven Zellen variierte trotz gleicher Anzahl ausplattierter Zellen zwischen den einzelnen Versuchen erheblich, wodurch sich hohe Standardabweichungen ergaben. Dies könnte damit zu erklären sein, dass es sich bei HUVECs um primäre Zellen handelt, die aus verschiedenen Isolationen stammen und dadurch im Zellverhalten variieren. Dennoch wurde die Tendenz zu einer verstärkten Migrations- und Invasionsfähigkeit durch die R707Q-Mutation deutlich. Für die grafische Darstellung wurden die Mittelwerte aus der Anzahl migrierter- und invasiver Zellen bei gleich ausplattierten Zellzahlen gebildet ($n=4$ mit $5 \cdot 10^3$ Zellen) (Abb. 27).

Die reduzierte Phosphorylierung von Cofilin an Ser3 sowie die erhöhte Migrations- und Invasionsfähigkeit der Zellen, die die mutierte PLC γ 1-Variante exprimierten, zeigen, dass die R707Q-Mutation die Motilität und Invasivität endothelialer Zellen begünstigt.

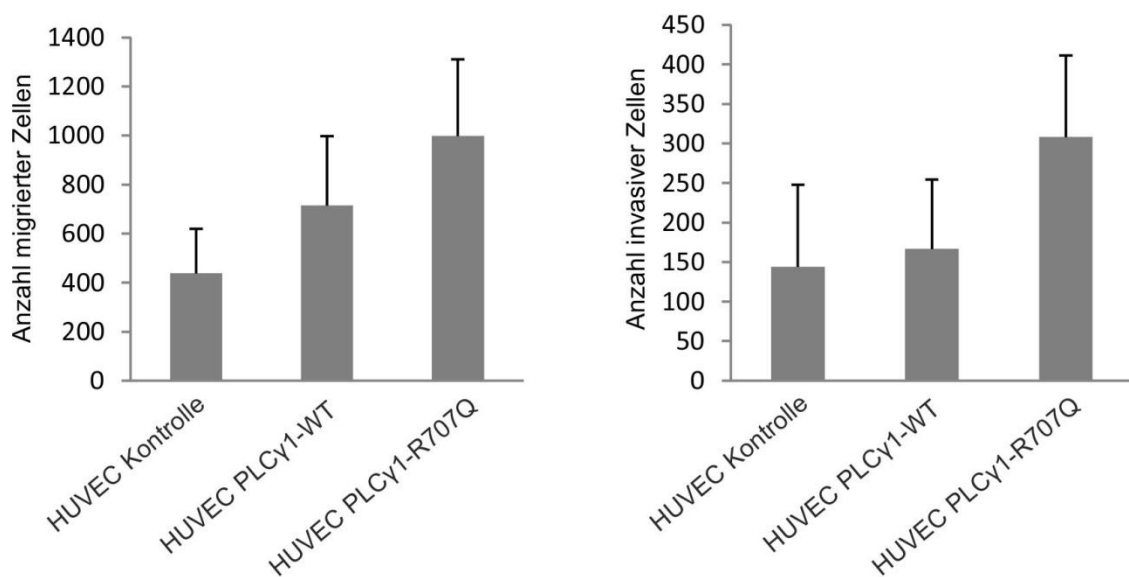


Abb. 27: Die PLC γ 1-R707Q-Mutation erhöht die Migration und Invasion endothelialer Zellen.

PLC γ 1 ist an der Migration und Invasion von Zellen beteiligt. Um zu untersuchen ob die R707Q-Mutation einen Einfluss auf das Migrations- und Invasionsverhalten endothelialer Zellen hat, wurden die transfizierten HUVECs in ein Zweikammer-Zellkultursystem überführt. Als Chemoattraktant wurde die untere Kammer mit ECGM gefüllt, wohingegen die obere Kammer mit Medium ohne Wachstumsfaktoren (*endothelial cell basal medium*) befüllt wurde. Nach einer Inkubation von 24 Std. wurden die migrierten bzw. invasiven Zellen fixiert, gefärbt und gezählt. Gezeigt werden die Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten mit $5 \cdot 10^3$ ausplattierten Zellen. Die Standardabweichungen sind in Form von Fehlerbalken dargestellt.

4.5 Untersuchung der PLC γ 1-Expression in den Patientenproben

Während der funktionellen Versuche wurde deutlich, dass nicht nur die R707Q-Mutation einen Effekt auf das Zellverhalten hat, sondern dass allein die Überexpression des PLC γ 1-WT sowohl die Apoptoseresistenz als auch das Migrations- und Invasionsverhalten endothelialer Zellen erhöht. Daher wurde die PLC γ 1-Expression in den primären kardialen Angiosarkomen untersucht (n=8), indem das FFPE-Gewebe mittels Immunhistochemie mit einem PLC γ 1-spezifischen Antikörper gefärbt wurde.

Während die PLC γ 1-Expression in den Endothelien normaler Blutgefäße unter der Nachweisgrenze lag, konnte bei 7 von 8 Angiosarkomen die Expression nachgewiesen werden. Dabei konnte bei 3 Fällen eine schwache, bei 2 Fällen eine mittelmäßig starke und bei 2 Fällen eine starke Expression beobachtet werden. Bei den 3 Angiosarkomen mit der PLC γ 1-R707Q-Mutation konnte keine oder lediglich eine schwache Expression detektiert werden (Abb. 28).

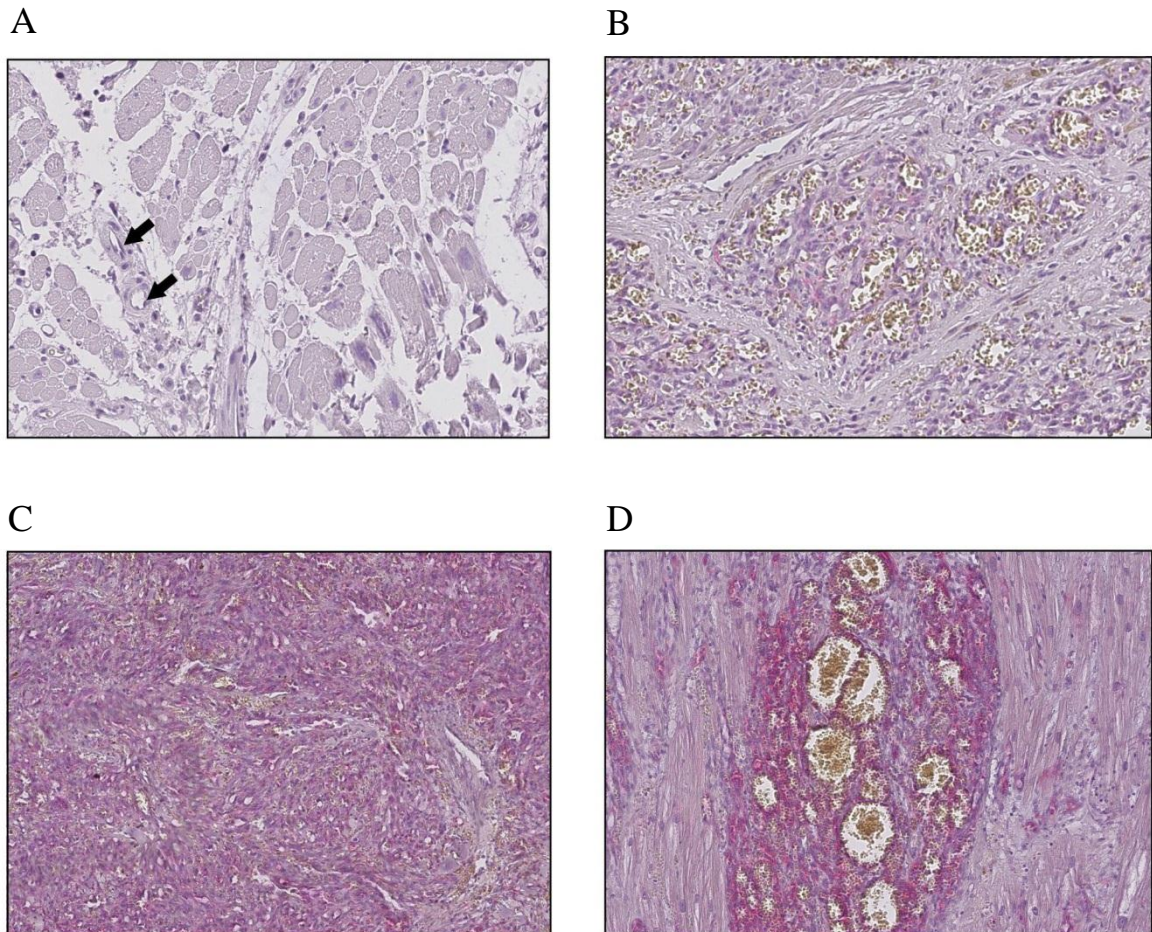


Abb. 28: Nachweis der PLC γ 1-Expression mittels Immunhistochemie.

Die Expression von PLC γ 1 wurde durch immunhistochemische Färbung an insgesamt 8 Patientenproben durchgeführt. (A) Die PLC γ 1-Expression in normalen endothelialen Zellen (schwarze Pfeile) liegt unter der Nachweisgrenze. (B-D) Die PLC γ 1-Expression eines Falls mit der R707Q-Mutation ist in B dargestellt. Eine mittelmäßig starke Expression eines Falls ohne R707Q-Mutation ist in C und eine starke Expression eines Falls ohne R707Q-Mutation ist in D abgebildet.

5. Diskussion

5.1 Screening der primären kardialen Angiosarkome

Da aufgrund der Seltenheit der primären kardialen Angiosarkome bisher keine systematischen Untersuchungen in Bezug auf genetische Aberrationen durchgeführt wurden und die Pathogenese dieser Tumore weitgehend unbekannt ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit 10 primäre kardiale Angiosarkome mit verschiedenen molekularpathologische Analyseverfahren untersucht. Diese beruhten nicht auf hypothesengetriebenen, sondern auf genomweiten Untersuchungen, die im Nachfolgenden als offene molekularpathologische Verfahren bezeichnet werden. Die kardialen Angiosarkome wurden sowohl auf größere numerische Aberrationen und kleinere Insertionen, Deletionen und Punktmutationen sowie auf veränderte miRNA-Expressionsmuster untersucht. Die Ergebnisse wurden zum Teil mit denen kardialer Sarkome NOS sowie mit Angiosarkomen anderer Primärlokalisation verglichen.

5.1.1 SNP-Array Analysen

Tumore weisen häufig aufgrund von geschädigten DNA-Reparaturmechanismen eine genomische Instabilität auf (89). Daher können in Tumoren oft größere numerische Aberrationen von Chromosomenabschnitten entstehen, die Auswirkung auf die Expression betroffener Gene haben können (55). Es existieren bislang nur wenige Studien, die durch zytogenetische Analysen die chromosomalen Veränderungen kardialer Angiosarkome untersucht haben.

Zur genomweiten Analyse auf größere numerische Aberrationen sowie *copy neutral loss of heterozygosity* (cnLOH) wurden die kardialen Angiosarkome im Rahmen dieser Arbeit mittels der Infinium HD Bead Chip Technologie von Illumina mit SNP-Arrays analysiert. In allen kardialen Angiosarkomen konnten chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden. Diese reichten von Zugewinnen, Verlusten oder cnLOHs des gesamten Chromosoms, über numerische Veränderungen des gesamten q- oder p-Arms bis hin zu Aberrationen, die einen Bereich kleiner als 2 Mb umfassten. Dabei konnten durchschnittlich 8 aberrante Chromosomen pro Fall nachgewiesen werden. In einer früheren Studie wurden an einem einzelnen kardialen Angiosarkom mittels konventioneller zytogenetischer Analyse 9 aberrante Chromosomen identifiziert (42). Bei den Sarkomen NOS und dem Rhabdomyosarkom, die im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mittels SNP-Array untersucht wurden, konnten hingegen durchschnittlich 17 aberrante Chromosomen nachgewiesen werden. In Bezug auf chromosomale Aberrationen werden die Sarkome im Allgemeinen in 2 Gruppen eingeteilt: diejenigen mit einem komplexen

Karyotyp und jene mit nahezu normalem Karyotyp (7). Durch die SNP-Analysen wurde deutlich, dass die kardialen Angiosarkome weder zu der einen noch zu der anderen Gruppe gehören, da sie einige Aberrationen aufwiesen, diese sich aber vom komplexen Karyotyp der kardialen Sarkome NOS und des Rhabdomyosarkoms stark unterschieden. Dies spricht dafür, dass diese Tumore trotz gleicher Lokalisation am Herzen in ihrer Entstehung und Entwicklung variieren.

Beim Vergleich der Angiosarkome untereinander konnte ein rekurrenter Zugewinn des gesamten q-Arms von Chromosom 1 in drei Fällen detektiert werden. Ein 1q-Zugewinn konnte bei der bereits erwähnten Studie an einem einzelnen Angiosarkom ebenfalls identifiziert werden (42). Die Rolle des 1q-Zugewinns für die Pathogenese der kardialen Angiosarkome wurde jedoch aufgrund der Vielfalt der von diesem Genabschnitt codierten Gene im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert. Ein Zugewinn des gesamten q-Arms von Chromosom 1 konnte bei Tumoren der Niere, die vor allem bei Kindern diagnostiziert werden (Wilm's Tumor), mit einem 4,3-fach höheren Sterberisiko in Verbindung gebracht werden und ist somit ein Marker für eine schlechte Prognose (90). Ob dies auch für kardiale Angiosarkome zutrifft ist unklar, da erst im Rahmen dieser Arbeit dieser rekurrente 1q-Zugewinn identifiziert wurde und keine Angaben zum Krankheitsverlauf der Patienten zur Verfügung standen. Rückschlüsse auf die Prognose dieser Patienten waren daher nicht möglich. Sofern sich dieser Zugewinn auch in weiteren kardialen Angiosarkomen identifizieren ließe, könnte die Rolle des rekurrenten 1q-Zugewinns in zukünftigen klinischen Studien genauer untersucht werden.

Ein kleinerer rekurrenter Zugewinn mit einem überlappenden Bereich von 2 Mb wurde außerdem auf dem q-Arm von Chromosom 4 in zwei kardialen Angiosarkomen identifiziert. In diesem Bereich befinden sich u.a. die Gene für die zwei Rezeptor-Tyrosinkinasen KIT und KDR. Durch immunhistochemische Färbungen konnte anschließend eine verstärkte Expression von KDR in den Fällen mit dem 4q-Zugewinn nachgewiesen werden. Eine Überexpression von KDR konnte früher bereits bei Angiosarkomen anderer Primärlokalisation durch immunhistochemische Analysen identifiziert werden, wobei die Ursache nicht geklärt wurde (23). Der Zugewinn auf dem q-Arm von Chromosom 4 hat hingegen keinen Einfluss auf die Expression von KIT, da im Gegensatz zu KDR keine erhöhte Expression gezeigt werden konnte. KDR wird spezifisch von endothelialen Zellen exprimiert und es ist bereits bekannt, dass KDR eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Angiogenese spielt und die Proliferation und Migration endothelialer Zellen anregt (16; 91). Durch die erhöhte Expression dieser Rezeptor-Tyrosinkinase könnte möglicherweise sowohl die Proliferation und somit das Tumorwachstum als auch die Migration und Invasion endothelialer Zellen gefördert werden. Daher könnte die Überexpression von KDR wesentlich zur Entstehung und Entwicklung kardialer Angiosarkome beitragen und die Metastasierung fördern.

5.1.2 miRNA Expression

Derzeit sind mehr als 1400 humane miRNAs bekannt, die für die normale Entwicklung und Differenzierung wichtig sind, aber auch Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von Tumoren haben können (58). Da miRNAs auch die Expression von Tumorsuppressor- und Onkogenen regulieren, werden Tumore immer häufiger auf veränderte miRNA-Expressionsmuster hin untersucht. Genomweite Studien zeigten, dass Tumore ein bestimmtes miRNA-Profil aufweisen, anhand dessen eine Differenzierung zwischen verschiedenen Tumorentitäten erfolgen kann (60). Dieses miRNA-Profil ist meist gewebespezifisch, sodass auch der Ursprung von Tumoren identifiziert werden kann, deren Herkunft morphologisch und immunhistochemisch unklar ist. Metastasen behalten das gewebespezifische Profil des Ursprungstumors bei, sodass die Lokalisation des Primärtumors identifiziert werden kann (60).

Da die Expression der miRNAs in kardialen Angiosarkomen bisher nicht untersucht wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression von 377 verschiedenen miRNAs mittels TaqMan Low Density Assay untersucht. Endothelien aus normalen Herzgefäßen konnten aufgrund geringer Mengen und einer schlechten Qualität nicht als Referenz genutzt werden. Daher wurde das miRNA-Expressionsmuster der kardialen Angiosarkome mit denen kardialer Sarkome NOS (einschließlich eines Rhabdomyosarkoms) verglichen, da diese ebenfalls ihren Ursprung in mesenchymalen Zellen haben. Im Nachfolgenden und in Bezug auf die miRNA Expressionsanalysen schließt die Bezeichnung Sarkome NOS das Rhabdomyosarkom mit ein.

Durch eine nicht-überwachte (engl.: *unsupervised*) Clusteranalyse konnte gezeigt werden, dass die kardialen Angiosarkome und die Sarkome NOS jeweils ein spezifisches miRNA-Expressionsmuster aufwiesen, weswegen sie als zwei unterschiedliche Gruppen betrachtet werden konnten. Dabei war allerdings zu berücksichtigen, dass die Sarkome NOS wahrscheinlich im Vergleich zum gesunden Gewebe ebenfalls veränderte miRNA-Expressionsmuster aufweisen, d.h. die identifizierten miRNAs könnten auch in den kardialen Angiosarkomen normal und in den Sarkomen NOS aberrant exprimiert sein. Daher konnte durch diese Untersuchung lediglich ein Hinweis auf potentiell differentiell exprimierte miRNAs der kardialen Angiosarkome im Vergleich zu den kardialen Sarkomen NOS gewonnen werden.

Für die Identifizierung differentiell exprimierter miRNAs wurde eine überwachte (engl.: *supervised*) Clusteranalyse durchgeführt, indem die miRNA Expressionsmuster der kardialen Angiosarkome mit denen kardialer Sarkome NOS verglichen wurden. Dadurch wurden 34 differentiell exprimierte miRNAs identifiziert, die möglicherweise eine Rolle bei der Pathogenese der kardialen Angiosarkome spielen könnten (*Fold Changes* >2; p-Wert ≤ 0,05). 21 der differentiell exprimierten miRNAs zeigten eine erhöhte und 13 eine reduzierte Expression, mit *Fold Changes* zwischen 3,6 und 912.

Die miR-450b-5p konnte mit einem *Fold Change* von 912 als die am stärksten reduzierte miRNA identifiziert werden. In zwei Studien wurde bereits beschrieben, dass die miR-450b-5p die Expression des paired box protein 6 (PAX6) inhibiert (92; 93). PAX6 stimuliert als Transkriptionsfaktor u.a. die Expression des Onkogens *MET*, welches in vielen Tumoren überexprimiert wird (94). In verschiedenen Tumorentitäten konnte bereits gezeigt werden, dass PAX6 an der Tumorgenese beteiligt ist, indem es die Proliferation und Invasion fördert (94; 95). Daher könnte eine verringerte Expression der miR-450b-5p zu einer verstärkten Expression von PAX6 in den kardialen Angiosarkomen führen. Dies könnte in weiterführenden Versuchen durch immunhistochemische Färbungen und mRNA-Expressionsanalysen an den Patientenproben untersucht werden.

Die miR-146b-5p konnte mit einem *Fold Change* von 229 als die am stärksten überexprimierte miRNA in den kardialen Angiosarkomen identifiziert werden. Die Funktion der miR-146b-5p ist jedoch noch nicht genau geklärt und zwischen verschiedenen Veröffentlichungen konträr. In einer Studie wurde eine Tumorsuppressor-Funktion beschrieben (96), wohingegen durch Analysen an Tumoren der Schilddrüse der miR-146b-5p eine onkogene Rolle zugeschrieben wurde (97).

Derzeit sind nur 2 Studien veröffentlicht, die die miRNA Expression an Angiosarkomen anderer Lokalisation untersuchten. Dabei konnte in einer Studie bei Angiosarkomen mit einer Amplifikation des *MYC*-Gens im Vergleich zu Angiosarkomen ohne *MYC*-Amplifikation eine erhöhte Expression des miRNA-Clusters miR-17-92 identifiziert werden, welches miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a und miR-92a umfasst (98). *MYC* ist an der Regulation des Zellwachstums und der Apoptose beteiligt und reguliert u.a. die Expression des miR-17-92-Clusters, weshalb die *MYC*-Amplifikation wahrscheinlich für die erhöhte Expression des miRNA-Cluster in der erwähnten Studie verantwortlich ist (98). Das miRNA-Cluster ist wiederum ein negativer Regulator für die Expression von Thrombospondin-I (THBSI), einem endogenen Inhibitor der Angiogenese (98). In den kardialen Angiosarkomen konnte ebenfalls eine erhöhte Expression der miR-17, miR-18a und miR-19a nachgewiesen werden. Die *Fold Changes* der miR-17-, miR-18a- und miR-19a-Expression, die sich durch den Vergleich mit den Sarkomen NOS ergaben, lagen zwischen 4 und 11. Durch die SNP-Analysen konnte bei den kardialen Angiosarkomen zwar keine Amplifikation des *MYC*-Gens, welches auf Chromosom 8 lokalisiert ist, identifiziert werden, jedoch war bei 3 der untersuchten Fälle das gesamte Chromosom 8 entweder durch einen Zugewinn oder durch einen cnLOH verändert. Die Ct-Werte für die miRNAs dieser 3 Fälle unterschieden sich jedoch nicht merklich von den Fällen ohne Aberration auf dem Chromosom 8. Diese könnten aber andere genetische oder epigenetische Veränderungen besitzen, die zur Überexpression von miR-17, miR-18a und miR-19a beitragen könnten. Durch die leicht erhöhte Expression der miR-17, miR-18a und miR-19a könnte also die Expression von THBSI in den kardialen Angiosarkomen

herunterreguliert sein. Dies könnte das Tumorwachstum fördern, denn THBSI hemmt die Proliferation und Migration endothelialer Zellen sowie die VEGF-vermittelte Signaltransduktion. Dies erfolgt u.a. dadurch, dass THBSI die inaktive Matrixmetalloproteinase-9 (MMP-9) und VEGF direkt binden kann und dadurch deren Aktivität bzw. Wirkung hemmt (99). Die Expression von THBSI in kardialen Angiosarkomen könnte in weiterführenden Versuchen durch immunhistochemische Färbungen und mRNA-Expressionsanalysen an den Patientenproben untersucht werden.

Eine etwas umfassendere Sammlung von miRNA-Expressionsprofilen verschiedener Tumorentitäten ist in der oncomir Datenbank (www.oncomir.umn.edu) zu finden, die 22 verschiedene Sarkomentitäten beinhaltet, die in der *Sarcoma microRNA Expression Database* (S-MED) zusammengefasst sind (100). Dabei wurden 5 Angiosarkome auf differentiell exprimierte miRNAs untersucht, indem die Expressionsmuster mit dem jeweiligen Referenzgewebe verglichen wurden. In dieser Studie konnten vor allem differentiell exprimierte miRNAs identifiziert werden, die auf Chromosom 19 lokalisiert sind. Dabei wurde meist eine starke Überexpression festgestellt. 3 miRNAs, die in S-MED als differentiell exprimiert für Angiosarkome beschrieben wurden, konnten in den kardialen Angiosarkomen ebenfalls als differentiell exprimiert identifiziert werden: miR-517b, miR-519a und miR-522. Allerdings wurde im Gegensatz zu S-MED eine stark reduzierte Expression nachgewiesen (*Fold Changes* zwischen 41 und 437), sodass keine Übereinstimmung festzustellen war.

Beim Vergleich mit früheren Studien konnten lediglich 3 der 34 differentiell exprimierten miRNAs der kardialen Angiosarkome ebenfalls bei Angiosarkomen anderer Lokalisation als verstärkt exprimiert identifiziert werden (miR-17, miR-18a und miR-19a). Die geringe Übereinstimmung könnte daran liegen, dass sowohl in den vorhandenen Studien als auch in der vorliegenden Arbeit verschiedene Primärlokalisationen untersucht und die miRNA-Expressionsdaten mit unterschiedlichen Referenzen verglichen wurden. Insbesondere der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Vergleich mit einer anderen Sarkomentität könnte ein Grund für die geringe Übereinstimmung sein. Dennoch liefern die Ergebnisse einen Überblick über differentiell exprimierte miRNAs, deren Rolle bei der Pathogenese kardialer Angiosarkome weiter untersucht werden sollte.

5.1.3 Next Generation Sequencing

Da die Pathogenese der primären kardialen Angiosarkome weitgehend unbekannt ist und bisher nur Mutationsanalysen für einzelne Gene durchgeführt wurden, wurden 6 Patientenproben, von denen DNA aus Tumor- und Normalgewebe gewonnen werden konnte, auf Punktmutationen sowie Insertionen und Deletionen (Indels) hin untersucht. Diese Tumore sind sehr selten, weswegen kaum Zugriff auf Frischgewebe besteht. Daher musste für die Analyse

Formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Material verwendet werden. DNA aus FFPE-Gewebe ist häufig degradiert, sodass nur kurze Fragmente amplifiziert werden können. Daher konnten Mutationsanalysen basierend auf der Sequenzierung des gesamten Genoms oder Exoms nicht durchgeführt werden, weswegen das sogenannte *targeted* NGS (tNGS) angewendet wurde. Dabei wurden mit 16.000 Primerpaaren des Comprehensive Cancer Panels nur 100-200 bp lange Amplifikate generiert, die bekannte Mutations-Hotspots in 409 häufig mutierten Tumorsuppressor- und Onkogenen abdecken.

Durch das tNGS konnten durchschnittlich 508 Mb Sequenz pro Fall generiert werden. Dabei wurde jede Base durchschnittlich 298-mal abgedeckt, wodurch eine hohe Sensitivität erreicht und die Detektion von Mutationen mit einer geringen Frequenz ermöglicht wurde. Durch den Vergleich der Tumorproben mit dem entsprechenden Normalgewebe konnte in jedem der 6 untersuchten Fälle mindestens eine Mutation in codierenden Regionen identifiziert und bestätigt werden (Mutationsfrequenz $\geq 10\%$). Insgesamt wurden dadurch 15 missense- und nonsense Mutationen nachgewiesen. Über die durchschnittliche Menge an Mutationen in den kardialen Angiosarkomen konnte keine Aussage getroffen werden, da durch die Verwendung des tNGS nur Mutations-Hotspots betrachtet wurden. Bei 6 der 15 Mutationen konnte eine C>T Substitution am CpG-Dinukleotid nachgewiesen werden. An diesem Dinukleotid entstehen mehr C>T Punktmutationen als an anderen Stellen, da das Cytosin in CpG-Dinukleotiden häufig methyliert wird und anschließend eine spontane Desaminierung zu einem Thymin führen kann (71; 101). Es ist bereits bekannt, dass die Methylierung von Cytosinen in der codierenden Region von *TP53* in mehr als 50% der Fälle der Grund für eine Inaktivierung des Tumorsuppressors in somatischen Zellen ist (101). Bei den kardialen Angiosarkomen führten 4 der 6 C>T Substitutionen am CpG-Dinukleotid zu einer Stop-Mutation, die vermutlich ebenfalls zur Inaktivierung des entsprechenden Gens beiträgt. Somit könnte u.a. die Methylierung von Cytosinen die Mutagenese in den kardialen Angiosarkomen insbesondere an den CpG-Dinukleotiden fördern.

5.1.3.1 Die identifizierten Mutationen betreffen vor allem Signalwege und Chromatin-modifizierende Proteine

Mutationen in Signalwegen

In allen Fällen konnte mindestens ein mutiertes Gen identifiziert werden, das an der Signaltransduktion beteiligt ist. Mutationen, die wichtige Signalmoleküle betreffen, sind in Tumoren schon lange bekannt. Die entsprechenden Signalmoleküle werden bereits durch spezifische Antikörper oder durch kleine inhibitorische Substanzen pharmakologisch beeinflusst (102). Nur 3 der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Mutationen sind bereits als aktivierende Mutationen (*FGFR1*-N546K, *NRAS*-Q61K und *RAF1*-S257L) beschrieben. Die

übrigen Mutationen sind zum Teil noch unbekannt oder wurden bisher nicht durch funktionelle Studien analysiert (103; 104; 105).

In 2 Fällen konnten verschiedene Mutationen in *KDR* identifiziert werden. Diese befanden sich zum einen in der extrazellulären Immunglobulin Domäne (R720W) und zum anderen in der Transmembrandomäne (T771K). Mutationen in *KDR* wurden bei Angiosarkomen anderer Primärlokalisation bereits beschrieben und traten mit einer Häufigkeit von 10% auf (24). Dabei konnte ebenfalls eine Mutation in der Aminosäure 771 (T771R) nachgewiesen werden. Über die Auswirkungen von Mutationen in der Transmembrandomäne von *KDR* ist bisher nichts bekannt und für die beschriebene T771R-Mutation wurden keine funktionellen Analysen durchgeführt. In der bereits erwähnten Veröffentlichung konnten in Angiosarkomen anderer Primärlokalisation neben der T771R-Mutation Mutationen in der extrazellulären Immunglobulin-Domäne sowie in der Kinasedomäne identifiziert werden, die beide zu einer Liganden-unabhängigen Aktivierung von *KDR* führten (24). Da endotheliale Zellen durch eine VEGF-vermittelte Aktivierung von *KDR* zur Proliferation und Migration angeregt werden, könnte eine erhöhte Aktivität der RTK zur Entstehung von Angiosarkomen beitragen (13). Daher könnten weiterführende Untersuchungen zur Klärung der Funktion, der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten *KDR*-Mutationen, beitragen.

In Bezug auf die Therapiemöglichkeiten könnte die Identifizierung von aktivierenden *KDR*-Mutationen in kardialen Angiosarkomen wichtig sein. Im Rahmen der bereits erwähnten Studie, bei der eine aktivierende Mutation von *KDR* in Angiosarkomen nachgewiesen wurde, wurden die *KDR*-Inhibitoren Sunitinib und Sorafenib bereits getestet (24). Durch funktionelle Versuche konnte in der Studie gezeigt werden, dass die mutationsbedingte, Liganden-unabhängige Aktivierung von *KDR* durch die Verwendung der *KDR*-Inhibitoren gehemmt werden konnte (24). Der *KDR*-Inhibitor Sorafenib wurde außerdem bereits in einer Phase II-Studie an 37 Angiosarkom-Patienten getestet. Dabei konnte bei einem Patienten eine komplette Remission, bei 4 Patienten eine partielle Remission, bei 21 Patienten ein stabiler und bei 11 Patienten ein fortschreitender Krankheitsverlauf beobachtet werden (32). In dieser Studie wurden die Patienten weder auf Mutationen in *KDR* noch auf eine Überexpression von *KDR* untersucht, was möglicherweise der Grund dafür sein könnte, dass nur bei wenigen Patienten eine Remission beobachtet wurde. Denn spezifische Tyrosinkinase-Inhibitoren sind nur dann wirksam, wenn der Tumor von einer aberranten Rezeptor-Tyrosinkinase-Aktivität abhängig ist (102).

Neben den Mutationen in *KDR*, die mittels tNGS in mehreren Fällen identifiziert wurden, konnte eine rekurrente Mutation in *PLCG1* (R707Q) in zwei Fällen nachgewiesen werden. Diese Mutation wurde in einem von 4 weiteren Fällen durch konventionelle Sanger-Sequenzierung ebenfalls identifiziert, sodass die *PLCG1*-R707Q-Mutation mit einer Häufigkeit von 30% in den kardialen Angiosarkomen nachgewiesen wurde. PLCγ1 besitzt zwei

SH2-Domänen, eine N-terminale SH2 Domäne (nSH2) für die Bindung an andere Proteine sowie eine C-terminale SH2 Domäne (cSH2), welche an der Autoinhibierung der Phospholipase beteiligt ist (74). Die R707Q-Mutation befindet sich in der hochkonservierten cSH2-Domäne, was neben der Rekurrenz der Mutation dafür spricht, dass die Aminosäure für die Funktion der Phospholipase wichtig ist. Daher lag die Vermutung nahe, dass diese Mutation Einfluss auf die Aktivität von PLC γ 1 hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch 7 Angiosarkome anderer Primärlokalisation auf diese rekurrente *PLCG1*-Mutation hin untersucht, die jedoch in diesen Fällen nicht nachgewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu wurde in einer kürzlich veröffentlichten Studie die *PLCG1*-R707Q-Mutation durch *whole-genome* und *whole-exome sequencing* sowie durch tNGS mit einer Häufigkeit von 9% auch in Angiosarkomen anderer Primärlokalisation nachgewiesen (27). Daher könnte diese Mutation generell an der Pathogenese von Angiosarkomen beteiligt sein und muss nicht spezifisch für Angiosarkome sein, die am Herzen lokalisiert sind.

PLC γ 1 wird in endothelialen Zellen durch die VEGF-vermittelte Aktivierung von KDR phosphoryliert und somit aktiviert und stellt das wichtigste Signalmolekül in der VEGF/KDR-vermittelten Signalkaskade dar (80). Nach der Aktivierung werden durch PLC γ 1 zwei wichtige *second messenger* generiert: IP₃ und DAG. Diese Signalmoleküle können weitere Signalwege aktivieren, die Einfluss auf die Proliferation, Apoptose sowie Migration und Invasion haben (80; 83; 84). Ein wichtiger, durch DAG aktivierter Signalweg, ist der RAF/MEK/ERK-Signalweg. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einem Fall eine Mutation in *RAF1/cRAF* nachgewiesen (S257L), die bereits als aktivierende Mutation beschrieben worden war (104).

Durch die tNGS-Analysen konnte gezeigt werden, dass in 5 der 6 untersuchten kardialen Angiosarkome die durch VEGF-vermittelte Signalkaskade von Mutationen betroffen war. Insbesondere die *KDR*-Mutationen, aber auch die bereits erwähnte Überexpression von *KDR* sowie die rekurrente *PLCG1*-Mutation weisen darauf hin, dass der *KDR*/PLC γ 1-Signalweg bei der Pathogenese der kardialen Angiosarkome eine entscheidende Rolle spielen könnte. Da endotheliale Zellen hauptsächlich durch die VEGF/KDR-vermittelte Signalkaskade sowohl zur Proliferation als auch zur Migration und Invasion angeregt werden, könnten die Mutationen sowie die Überexpression von *KDR* das Tumorstadium und die Metastasierung der kardialen Angiosarkome fördern.

Mutationen in Chromatin-modifizierenden Proteinen

In 50% der mittels tNGS untersuchten kardialen Angiosarkome wurden Mutationen in Genen nachgewiesen, die bei der Chromatinmodifikation eine Rolle spielen. Mutationen in Proteinen, die die posttranslationalen Modifikationen der Histone beeinflussen, wurden vor allem durch die NGS-Verfahren in den letzten Jahren vermehrt in Tumoren identifiziert (106). Dadurch

wurde deutlich, dass die Tumor-spezifischen epigenetischen Mechanismen dazu führen können, dass Onkogene vermehrt aktiviert oder Tumorsuppressorgene verstärkt inaktiviert werden (60). Da in 3 von 6 kardialen Angiosarkomen Mutationen in Chromatin-modifizierenden Proteinen identifiziert wurden, könnte dies ein Hinweis dafür sein, dass epigenetische Dysregulationen auch bei der Entstehung der kardialen Angiosarkome eine wichtige Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in zwei Chromatin-modifizierenden Proteinen (MLL2 und ASXL1) Mutationen nachgewiesen, die jeweils zu einem Stop-Codon und somit vermutlich zur Inaktivierung des entsprechenden Proteins führen. Mutationen im *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia protein 2* (MLL2) wurden in 2 Fällen identifiziert, wobei in einem Fall zwei Stop-Mutationen auftraten. MLL2 ist eine Histon H3 Lysin 4 (H3K4)-spezifische Methyltransferase, die durch die Methylierung von H3K4 an der Aktivierung von Genen beteiligt ist (107). In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass MLL2 die Expression von Tumorsuppressorgenen fördert (72). Durch Genom- und Exom-Sequenzierungen von non-Hodgkin Lymphomen wurden Mutationen in *MLL2* identifiziert, die über das gesamte Exom verteilt waren und in 91% der Fälle zur Inaktivierung des Proteins führten. MLL2 wurde daher in non-Hodgkin-Lymphomen als wichtiger Tumorsuppressor nachgewiesen (108). Die Doppel-Mutation in einem der kardialen Angiosarkome könnte ein Hinweis dafür sein, dass beide Allele mutiert sind. Dies würde zum kompletten Funktionsverlust von MLL2 führen, sodass MLL2 auch bei den kardialen Angiosarkomen ein wichtiger Tumorsuppressor sein könnte, denn bei Tumorsuppressorgenen müssen beide Allele von genetischen Aberrationen betroffen sein, bevor es zum *loss-of-function* kommt (109). *Additional sex combs 1* (ASXL1) ist an der Inaktivierung von Genen beteiligt, indem es u.a. mit dem *Polycomb repressive complex 2* (PRC2) interagiert und dadurch zur Trimethylierung von H3K27 beiträgt, wodurch die Kondensation des Chromatins gefördert wird (110). *Loss-of-function* Mutationen in *ASXL1* konnten ebenfalls in myeloischen Erkrankungen verbunden mit einer schlechteren Prognose nachgewiesen werden (111). In einer weiteren Studie wird ASXL1 bereits als Tumorsuppressor beschrieben (112). Die Identifizierung von Stop-Mutationen könnte darauf hinweisen, dass MLL2 und ASXL1 auch in den kardialen Angiosarkomen eine wichtige Tumorsuppressor-Funktion haben und daher vermehrt durch Mutationen still gelegt werden.

5.2 Die Rolle der PLC γ 1-R707Q Mutation bei der Pathogenese primärer kardialer Angiosarkome

Da die PLC γ 1-R707Q Mutation in 3 von 10 kardialen Angiosarkomen nachgewiesen wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss dieser Mutation auf die PLC γ 1-spezifischen Signalwege untersucht. Darüber hinaus wurden Versuche durchgeführt, die den Einfluss auf die

Proliferation, Apoptose sowie Migration und Invasion endothelialer Zellen untersuchten. Um die mutierte PLC γ 1-Variante in den Zellen ausprägen zu können, wurde die R707Q-Mutation mittels zielgerichteter Mutagenese in einen PLC γ 1-Expressionsvektor eingefügt.

Es wurde bereits beschrieben, dass PLC γ 1 das wichtigste Signalmolekül der KDR-vermittelten Signalkaskade in endothelialen Zellen ist. Somit ist PLC γ 1 durch die VEGF/KDR-vermittelte Aktivierung an der Proliferation sowie Motilität und Invasion endothelialer Zellen beteiligt (80). Im inaktiven Zustand von PLC γ 1 blockiert die cSH2-Domäne die katalytische Domäne durch eine intramolekulare Interaktion. Nach der Liganden-induzierten Aktivierung und Autophosphorylierung von KDR bindet PLC γ 1 über die nSH2-Domäne an einen Phosphotyrosinrest von KDR. Nach der Bindung an KDR wird PLC γ 1 an Y783 phosphoryliert, woraufhin die cSH2-Domäne an das phosphorylierte Tyrosin bindet. Durch diese Interaktion kommt es zu einer Konformationsänderung, sodass die cSH2-Domäne das katalytische Zentrum frei gibt und die Autoinhibierung aufgehoben wird (74; 75).

Die Interaktion der autoinhibitorischen Domäne mit dem p-Y783 und die daraus resultierende Konformationsänderung sind also für die Aktivierung von PLC γ 1 essentiell. Durch die Überexpression der PLC γ 1-WT-Variante in den HUVECs konnte bereits unter Standardbedingungen eine deutliche Phosphorylierung an Y783 gezeigt werden. Vermutlich erfolgt bereits durch ein Grundlevel an Wachstumsfaktoren im Kulturmedium eine RTK-abhängige Aktivierung. Bei der Überexpression der PLC γ 1-R707Q-Variante konnte hingegen nur eine geringe Phosphorylierung an Y783 beobachtet werden. Durch die Erhöhung der Konzentration an Wachstumsfaktoren im Medium konnte lediglich eine schwache Zunahme der Phosphorylierung an Y783 bei der mutierten Variante gezeigt werden, wohingegen eine starke Zunahme der Phosphorylierung beim WT beobachtet wurde. Eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung konnte sowohl beim WT als auch bei der Mutante durch die Verwendung eines Phosphatase-Inhibitors nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die PLC γ 1-R707Q-Mutante zwar durch RTKs phosphoryliert werden kann, aber im Vergleich zum WT zugänglicher für Phosphatasen ist und deshalb verstärkt dephosphoryliert wird. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die R707Q-Mutation eine Konformationsänderung der autoinhibitorischen cSH2-Domäne bewirkt. Vermutlich wird das Phosphat an Tyrosin 783 durch die Interaktion mit der cSH2-Domäne vor Phosphatasen geschützt. Eine mutationsbedingte Konformationsänderung könnte dazu führen, dass die cSH2-Domäne nicht mehr mit dem p-Y783 interagiert, sodass das p-Y783 nicht mehr geschützt wird und frei zugänglich für Phosphatasen ist. In einer Studie, die die Regulation von PLC γ 1 durch Herstellung verschiedener Mutationen innerhalb der autoinhibitorischen cSH2-Domäne untersuchte, konnte ebenfalls eine reduzierte Phosphorylierung in Abwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren beobachtet werden (75).

Trotz der verstärkten Dephosphorylierung an Y783 konnte eine stärkere Aktivierung der PLC γ 1-spezifischen Signalwege durch die Überexpression der PLC γ 1-R707Q Variante im Vergleich zum PLC γ 1-WT gezeigt werden. Es konnte sowohl eine verstärkte Phosphorylierung von cRAF, MEK und ERK1/2 als auch eine erhöhte IP3-Freisetzung und Ca²⁺-abhängige Dephosphorylierung und somit Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT im Vergleich zum PLC γ 1-WT gezeigt werden. Außerdem konnte auch für Cofilin, einem Aktin-bindenden Protein, welches an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt ist, eine geringere Phosphorylierung und somit eine erhöhte Aktivierung durch die Überexpression von PLC γ 1-R707Q gezeigt werden. Dies unterstützt die Vermutung, dass die R707Q-Mutation eine Konformationsänderung der autoinhibitorischen cSH2-Domäne bewirkt, die vermutlich dazu führt, dass die cSH2-Domäne die katalytische Domäne nicht mehr blockiert. Diese Vermutungen sind in Übereinstimmung mit einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der durch eine *in-silico* Modellierung gezeigt wurde, dass die R707Q-Mutation zu einer Destabilisierung der cSH2-Domäne führt (27). Daher kommt es vermutlich zur konstitutiven Aktivierung von PLC γ 1, die unabhängig von der KDR-vermittelten Phosphorylierung an Y783 ist.

Neben der verstärkten Aktivierung der PLC γ 1-spezifischen Signalwege wurde außerdem deutlich, dass die transiente Transfektion des PLC γ 1-R707Q-Plasmids sowohl in den HEK293 Zellen als auch in den HUVECs im Allgemeinen mit einer schwächeren PLC γ 1-Expression im Vergleich zum PLC γ 1-WT verbunden war. Dies wiederholte sich auch in allen weiteren Versuchen, obwohl immer gleiche Plasmidmengen aus verschiedenen Präparationen verwendet wurden. Dies könnte an regulatorischen Mechanismen liegen, die möglicherweise dazu führen, dass die mutierte Variante schneller abgebaut wird als die WT-Variante. Allerdings sind die Mechanismen, die zur Regulation der PLC γ 1-Menge führen, bisher unbekannt.

Trotz der umfangreichen Sequenzierungs-Projekte, die durch die Entwicklung der NGS-Verfahren mittlerweile an sehr vielen verschiedenen Tumorentitäten durchgeführt werden, wurde neben der R707Q-Mutation in Angiosarkomen anderer Lokalisation bisher nur eine rekurrente und potentiell aktivierende Mutation in der katalytischen Domäne von PLC γ 1 (S345F) beschrieben, die in kutanen T-Zelllymphomen nachgewiesen wurde (27; 113). Funktionelle Versuche zeigten, dass die S345F-Mutation die PLC γ 1-vermittelte Aktivierung von NFAT verstärkt, wodurch die Proliferation und das Überleben der Tumorzellen gefördert werden (113). NFAT wird durch die Serin/Threonin-Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert und kann daraufhin als Transkriptionsfaktor an spezifische Bindungsmotive der DNA binden (78; 79). Im Rahmen dieser Arbeit konnte, durch die R707Q-Mutation eine schwächere Phosphorylierung von NFAT in den endothelialen Zellen nachgewiesen werden, was ebenfalls für eine verstärkte Aktivität spricht. Es wurde bereits gezeigt, dass NFAT in endothelialen Zellen die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) regulierte, die wiederum die Migration

und die Angiogenese fördert (114). Die Expressionslevel der Zielgene von NFAT könnten in weiterführenden Versuchen nach der Überexpression von PLC γ 1-R707Q in endothelialen Zellen durch *real-time* PCR untersucht werden.

Sowohl die S345F-Mutation als auch die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte R707Q-Mutation führen zu einer verstärkten PLC γ 1-Signalkaskade, die möglicherweise die Entstehung und Entwicklung der Tumore beeinflusst. Da die S345F-Mutation aber weder im Rahmen dieser Arbeit, noch durch die Studie an Angiosarkomen anderer Lokalisation nachgewiesen wurde, könnte es sein, dass unterschiedliche aktivierende PLC γ 1-Mutationen spezifisch für verschiedene Tumorentitäten sind.

Durch die Untersuchung der PLC γ 1-spezifischen Signalwege konnte gezeigt werden, dass die R707Q-Mutation eine aktivierende Mutation ist. Daher wurde der Einfluss auf das Zellverhalten untersucht. Dafür wurden HUVECs verschiedener Isolationen verwendet. Vorhandene Studien liefern Anhaltspunkte, dass KDR über den PLC γ 1-RAF/MEK/ERK-Signalweg die Proliferation endothelialer Zellen fördert (76; 80). Interessanterweise konnte in einer anderen Studie gezeigt werden, dass die Inaktivierung von PLC γ 1 in NR6-Zellen keinen Effekt auf die Proliferation hat (115). Im Rahmen dieser Arbeit führte weder die Überexpression des PLC γ 1-WT noch die aktivierende R707Q-Mutation zu einer verstärkten Proliferation der HUVECs. Obwohl andere Studien auf einen Zusammenhang zwischen PLC γ 1 und Proliferation hindeuten, könnten die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit ein Hinweis dafür sein, dass das Proliferationsverhalten endothelialer Zellen nicht allein vom PLC γ 1-Signalweg abhängig ist.

Die bereits beschriebene anti-apoptotische Rolle von PLC γ 1 konnte durch die Expression der PLC γ 1-R707Q-Variante in endothelialen Zellen bestätigt werden (81; 82; 83). Bereits unter normalen Zellkulturbedingungen und ohne RTK-Stimulation konnte durch die R707Q-Mutation eine erhöhte Apoptoseresistenz der primären endothelialen Zellen beobachtet werden, was durch die Verwendung eines Apoptose-induzierenden Zytostatikums noch deutlicher wurde. Diese anti-apoptotische Wirkung wird vermutlich vor allem durch die DAG-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C- α (PKC α) hervorgerufen, da bereits gezeigt werden konnte, dass PKC α nach der PLC γ 1-induzierten Aktivierung das anti-apoptotische Protein Bcl-2 phosphoryliert und die Caspase-3 inhibiert (82).

Darüber hinaus ist PLC γ 1 an der Reorganisation des Zytoskeletts sowie an der Migration und Invasion der Zellen beteiligt (84; 85; 86). Durch die Überexpression der PLC γ 1-R707Q-Mutante in endothelialen Zellen konnte sowohl ein erhöhtes Migrations- als auch Invasionspotential im Vergleich zum PLC γ 1-WT beobachtet werden. Dabei spielt vermutlich das Aktin-bindende Protein Cofilin eine wichtige Rolle, das durch die PLC γ 1-vermittelte PIP2-Hydrolyse freigesetzt wird und im unphosphorylierten Zustand zur Remodellierung der Aktinfilamente beiträgt (87; 88). Bei den PLC γ 1-R707Q exprimierenden

Zellen konnte eine geringere Phosphorylierung von Cofilin im Vergleich zum PLC γ 1-WT beobachtet werden, was dafür spricht, dass Cofilin durch die R707Q-Mutation verstärkt aktiv ist und durch die Remodellierung des Zytoskeletts die Migrations- und Invasionsfähigkeit der endothelialen Zellen fördern könnte.

Durch diese funktionellen Analysen konnte gezeigt werden, dass die R707Q-Mutation zu einer RTK-unabhängigen, konstitutiven Aktivierung von PLC γ 1 führt. Durch die Verwendung endothelialer Zellen konnte ein Bezug zu Angiosarkomen hergestellt werden, da diese aus endothelialen Zellen hervorgehen (9). Da die Apoptoseresistenz sowie die Fähigkeit zur Migration und Invasion der endothelialen Zellen durch die Mutation erhöht wurde, könnte die PLC γ 1-R707Q-Mutation zur Entstehung und Entwicklung der kardialen Angiosarkome wesentlich beitragen und u.a. ein Grund für die hohe Metastasierungsrate sein.

Neben den funktionellen Versuchen konnte in 7 von 8 untersuchten kardialen Angiosarkomen im Vergleich zu normalen Endothelien eine höhere PLC γ 1-Expression immunhistochemisch nachgewiesen werden, wobei die 3 Fälle mit der PLC γ 1-R707Q Mutation nur eine schwache Expression zeigten. Im Rahmen der funktionellen Versuche konnte außerdem beobachtet werden, dass allein die Überexpression von PLC γ 1-WT das Zellüberleben sowie die Migration und Invasion endothelialer Zellen fördert. Dies könnte darauf hindeuten, dass die PLC γ 1-vermittelten Signalwege eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der kardialen Angiosarkome spielen. Dementsprechend könnte nicht nur eine aktivierende PLC γ 1-Mutation sondern möglicherweise auch eine Überexpression von PLC γ 1 an der Entstehung und Entwicklung kardialer Angiosarkome beteiligt sein.

5.3 Fazit und Ausblick

Durch die offenen molekularpathologischen Analysen konnten größere numerische Aberrationen, verschiedene Punktmutationen in Signalwegen und Chromatin-modifizierenden Proteinen sowie differentiell exprimierte miRNAs identifiziert werden, die an der Pathogenese der kardialen Angiosarkome beteiligt sein könnten. Insgesamt wurde deutlich, dass der KDR-vermittelte Signalweg in 60% der untersuchten kardialen Angiosarkome betroffen war. Es konnten zum einen ein kleiner rekurrenter Zugewinn auf dem Chromosom 4, der mit einer Überexpression von KDR verbunden war und zum anderen Punktmutationen in *KDR* selbst oder Mutationen in Signalmolekülen, die durch KDR aktiviert werden, nachgewiesen werden. Da die Angiosarkome aus endothelialen Zellen hervorgehen, die wiederum hauptsächlich durch die VEGF/KDR-vermittelte Aktivierung zur Proliferation und Migration angeregt werden, ist es nicht ungewöhnlich, dass vor allem Aberrationen in dem für die endothelialen Zellen wichtigen Signalweg zu finden sind (13). Insbesondere die rekurrente *PLCG1*-Mutation in 3 von 10 Fällen verdeutlicht, dass der KDR-vermittelte Signalweg vermutlich eine wesentliche Rolle bei der

Pathogenese der kardialen Angiosarkome spielt. Durch die Aberrationen im KDR-Signalweg wird vermutlich die Proliferation endothelialer Zellen und somit die Entstehung der Angiosarkome gefördert. Daher ist eine Therapie basierend auf der Hemmung von KDR durch Verwendung von KDR-Inhibitoren ein vielversprechender Ansatzpunkt bei der Behandlung von Angiosarkomen.

Die Identifikation der aktivierenden PLC γ 1-R707Q-Mutation in 30% der kardialen Angiosarkome bietet einen weiteren Einblick in die Pathogenese der kardialen Angiosarkome und sollte bei möglichen Therapien mit KDR-Inhibitoren berücksichtigt werden, denn KDR aktiviert PLC γ 1 (80). Daher würde der Signalweg beim Vorhandensein der PLC γ 1-R707Q-Mutation trotz KDR-Inhibitoren vermutlich aktiviert bleiben und das Medikament damit unwirksam machen. Bei der Verwendung einer zielgerichteten Therapie wäre daher eine Inaktivierung des KDR-Signalweges nicht über KDR selbst, sondern über nachfolgende Signalmoleküle zu überlegen und an endothelialen Zellen zu testen. Die Inhibierung von PLC γ 1 wäre dabei wahrscheinlich die effektivste Methode. Die Wirkung des als PLC-Inhibitor beschriebenen Wirkstoffs U73122 ist jedoch bisher nicht ausreichend geklärt. In einigen Studien hat U73122 zur Inhibierung von verschiedenen PLC-Isoformen beigetragen, wohingegen auch schon ein aktivierender Effekt beschrieben wurde (116). Daher sollten PLC-spezifische Inhibitoren weiter entwickelt und getestet werden. Zudem könnte eine Inaktivierung auch über die PLC γ 1-spezifischen Signalwege erfolgen, bspw. könnte durch bekannte PKC-Inhibitoren die Aktivierung des RAF/MEK/ERK-Signalweges reduziert werden (117; 118). In Verbindung mit der identifizierten PLC γ 1-S345F-Mutation, die in einer kürzlich veröffentlichten Studie beschrieben wurde, wurde der Calcineurin-Inhibitor FK-506 getestet. Dieser führte zu einer Abnahme der Zellproliferation und förderte den programmierten Zelltod (113).

Neben den Aberrationen im KDR-Signalweg konnten in einem signifikanten Anteil der kardialen Angiosarkome Mutationen in Genen nachgewiesen werden, die an der Modifikation des Chromatins beteiligt sind. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass epigenetische Dysregulationen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von kardialen Angiosarkomen spielen und weiter untersucht werden sollten. Dabei bietet MLL2 einen guten Ansatzpunkt für funktionelle Versuche, da in zwei Fällen Stop-Mutationen identifiziert wurden. Daher könnte bspw. durch eine Inaktivierung des *MLL2*-Gens in endothelialen Zellen der Einfluss auf Proliferation und Apoptose untersucht werden. Dies könnte mittels des CRISPR/Cas9-Systems durchgeführt werden. Dieses System ermöglicht die Editierung der DNA, indem durch die Endonuklease Cas9 die DNA Sequenz-spezifisch geschnitten wird, wodurch es zum kompletten Funktionsverlust des dort codierten Proteins kommt (119; 120).

6. Zusammenfassung

Primäre kardiale Angiosarkome sind sehr seltene maligne Tumore, die vom Endothel der Gefäße ausgehen und mit einer schlechten Prognose verbunden sind. Oft sind endotheliale Tumore schwer zu therapieren, da sie ein hohes Metastasierungspotential aufweisen. Aufgrund der Seltenheit der kardialen Angiosarkome und der geringen Anzahl molekularbiologischer Studien ist die Pathogenese weitgehend unbekannt. Um einen Einblick in die Mechanismen zu erhalten, die bei der Entstehung und Entwicklung der kardialen Angiosarkome eine Rolle spielen könnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit 10 primäre kardiale Angiosarkome durch verschiedene genomweite Analyseverfahren untersucht.

Durch die genomische Instabilität von Tumoren können größere numerische Aberrationen von Chromosomenabschnitten entstehen, welche Auswirkungen auf die Expression betroffener Gene haben können. Daher wurden die Angiosarkome durch SNP-Array Analysen auf größere numerische Aberrationen hin untersucht. Neben einem rekurrenten Zugewinn des gesamten q-Arms von Chromosom 1 in drei Fällen konnte ein kleiner rekurrenter Zugewinn auf Chromosom 4 in zwei Fällen nachgewiesen werden. Dieser Abschnitt codiert u.a. für die Rezeptor-Tyrosinkinasen KIT und KDR. Durch die immunhistochemische Färbung von KDR konnte bei den Fällen mit dem 4q-Zugewinn eine Überexpression von KDR gezeigt werden.

Die Rolle der MicroRNAs bei der Pathogenese von Tumoren gewinnt zunehmend an Bedeutung, denn diese kurzen, nicht codierenden RNAs regulieren die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene und haben Einfluss auf die Expression von Tumorsuppressor- und Onkogenen. Daher wurde die Expression von 377 gut beschriebenen miRNAs in den kardialen Angiosarkomen mittels TaqMan Low Density Arrays untersucht. Durch den Vergleich mit kardialen Sarkomen NOS und einem Rhabdomyosarkom, die wie die Angiosarkome aus mesenchymalen Zellen hervorgehen, konnten 34 differentiell exprimierte miRNAs in den kardialen Angiosarkomen identifiziert werden.

Durch die Untersuchung bekannter Mutations-Hotspots in 409 häufig mutierten Tumorsuppressor- und Onkogenen konnte mittels tNGS in allen untersuchten kardialen Angiosarkomen (n=6) mindestens eine Austauschmutation in einem Gen identifiziert werden, welches an der Signaltransduktion beteiligt ist. In 50% der Fälle wurden Stop-Mutationen in Genen nachgewiesen, die bei der Chromatinmodifikation eine Rolle spielen. Dabei konnten wiederholt verschiedene missense Mutationen in *KDR* und verschiedene Stop-Mutationen in *MLL2* identifiziert werden. Außerdem wurde eine rekurrente Mutation in *PLCG1* (R707Q) in 3 von 10 kardialen Angiosarkomen nachgewiesen, die in der autoinhibitorischen cSH2-Domäne der Phospholipase lokalisiert ist. PLCγ1 wird gewöhnlich durch eine RTK-abhängige

Phosphorylierung an Y783 aktiviert und generiert durch die Hydrolyse von PIP2 die *second messenger* DAG und IP3, welche über die Aktivierung von PKC α und über die Freisetzung von Ca²⁺ die Proliferation, Migration und Apoptose beeinflussen. Die Überexpression von PLC γ 1-R707Q in endothelialen Zellen (HUVEC) bewirkte eine RTK-unabhängige Aktivierung der PLC γ 1-spezifischen Signalwege. Es konnte sowohl eine verstärkte Phosphorylierung von cRAF, MEK und ERK1/2 als auch eine erhöhte IP3-Freisetzung und Ca²⁺-abhängige Dephosphorylierung und somit eine stärkere Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT im Vergleich zum PLC γ 1-WT gezeigt werden. Außerdem konnte auch für Cofilin, einem Aktin-bindenden Protein, welches an der Reorganisation des Zytoskeletts beteiligt ist, eine geringere Phosphorylierung und somit eine erhöhte Aktivierung durch die Überexpression von PLC γ 1-R707Q in den endothelialen Zellen im Vergleich zum WT gezeigt werden. Auf zellulärer Ebene hatte die PLC γ 1-R707Q-Mutation keinen Einfluss auf die Proliferation der endothelialen Zellen, wohingegen die Apoptoseresistenz und die Fähigkeit zur Migration und Invasion erhöht wurden. Die funktionellen Versuche zeigten, dass die PLC γ 1-R707Q-Mutation zu einer RTK-unabhängigen und konstitutiven Aktivierung von PLC γ 1 führt.

Insgesamt wurde deutlich, dass KDR und der KDR-vermittelte Signalweg in 60% der untersuchten kardialen Angiosarkome durch genomische Aberrationen betroffen war. Dies zeigte sich entweder durch größere chromosomale Aberrationen, durch Punktmutationen von *KDR* oder aufgrund von Mutationen in Signalmolekülen, die durch KDR aktiviert werden. Neue Therapieansätze zur Behandlung der Angiosarkome basieren auf der Inhibierung von KDR durch Verwendung von KDR-Inhibitoren. Die Identifikation der aktivierenden PLC γ 1-Mutation verdeutlicht eine alternative Aktivierung der KDR/PLC γ 1-vermittelten Signalkaskade in Angiosarkomen und sollte bei einer KDR-basierenden Therapie berücksichtigt werden.

7. Summary

Primary cardiac angiosarcomas are very rare tumors originating from endothelial cells and having an unfavorable prognosis. These endothelial tumors are difficult to treat because of the marked propensity to metastasize. Knowledge regarding pathogenesis is very limited until now due to the rarity of these tumors and the very small number of molecular biology studies. Therefore, to gain further insight into the pathogenesis of primary cardiac angiosarcomas, a collection of 10 cases was investigated by using different genome-wide analyses.

Tumors are often associated with genomic instability, which leads to chromosomal aberrations with effects on gene expression. SNP arrays were used to detect larger genomic aberrations of primary cardiac angiosarcomas. Besides repeated gains of the chromosome 1q in three cases a recurrent gain of a small region of chromosome 4, which contains the two receptor tyrosine kinase (RTK) genes, *KIT* and *KDR*, was identified in two of the cases. Immunohistochemical staining of KDR revealed a strong expression of KDR in both cases with the small recurrent gain of chromosome 4q.

The role of miRNAs for the pathogenesis of tumors has become more evident during the last years. These small non-coding RNAs are involved in the posttranscriptional regulation of gene expression, including expression of tumorsuppressor- and oncogenes. The TaqMan Low Density Array was used to analyze the expression pattern of 377 miRNAs in cardiac angiosarcomas. 34 differentially expressed miRNAs were identified by comparing cardiac sarcomas NOS and one rhabdomyosarcoma with the cardiac angiosarcomas.

Targeted next generation sequencing (tNGS) was used to detect mutations in 409 frequently mutated tumorsuppressor- and oncogenes. All cardiac angiosarcomas analyzed (n=6) had at least one replacement mutation in a gene, which is involved in signal transduction and in 50% stop-mutations were observed in chromatin modifiers. Different missense mutations were found in *KDR* and several stop-mutations were detected in *MLL2*. Furthermore, a recurrent missense mutation in the highly conserved cSH2 domain of *PLCG1* (R707Q) was identified in 3 of 10 cardiac angiosarcomas. PLC γ 1 is usually activated by a RTK-dependent phosphorylation of Y783 and cleaves PIP2 to generate the two second messengers DAG and IP3. This leads to activation of PKC and Ca²⁺-release with effects on cellular proliferation, migration and invasiveness. The ectopic expression of PLC γ 1-R707Q in endothelial cells (HUVECs) caused RTK-independent activation of PLC γ 1-specific signaling pathways with increased cRAF/MEK/ERK1/2 phosphorylation, increased IP3 amounts and a rise in Ca²⁺-dependent dephosphorylation increased activation of the transcription factor NFAT compared to ectopic expressed PLC γ 1-wildtype. Furthermore, cofilin, an actin-binding protein, whose activation is associated with actin skeleton reorganization, showed decreased phosphorylation, and thus activation, after expression of PLC γ 1-R707Q compared to PLC γ 1-wildtype. At the cellular level

expression of PLC γ 1-R707Q in endothelial cells had no influence on the proliferation rate, but increased migration and invasiveness as well as the resistance to apoptosis. These findings strongly suggest that the PLC γ 1-R707Q mutation causes constitutive activation of PLC γ 1.

In summary, in 60% of the cardiac angiosarcomas genomic aberrations in the KDR-induced signaling pathways were identified. These included point mutations or larger chromosomal aberrations of *KDR*, or point mutations in signaling molecules of the KDR-induced signaling pathway. Current therapeutic approaches to treat cardiac angiosarcomas are based on the inhibition of KDR by using KDR inhibitors. The identification of the activating PLC γ 1 mutation represents an alternative way of activation of KDR/PLC γ 1 signaling bypassing KDR activation in angiosarcomas and PLC γ 1 should therefore also be considered as important therapeutic target.

TaqMan® Human MicroRNA Array A

1	2	3	4	5	6	7	8	Port													
has-let -7a	has-let -7d	has-let -7e	has-let -7f	has-mir -1	has-mir -9	has-mir -10a	has-mir -10b	Mamm U6	Mamm U6	has-mir -15a	has-mir -15b	has-mir -16	has-mir -17	has-mir -18a	has-mir -18b	has-mir -19a	has-mir -19b	has-mir -20a	has-mir -20b	has-mir -21	has-mir -22
has-mir -23a	has-mir -24	has-mir -25	has-mir -26a	has-mir -27a	has-mir -27b	has-mir -28	has-mir -28.5p	Mamm U6	Mamm U6	has-mir -29a	has-mir -29b	has-mir -29c	has-mir -30b	has-mir -30c	has-mir -31	has-mir -32	has-mir -33a	has-mir -34a	has-mir -34c.5p	has-mir -35a	has-mir -36
has-mir -95	has-mir -96	has-mir -98	has-mir -99a	has-mir -100	has-mir -101	has-mir -103	has-mir -105	RNA44	has-mir -106b	has-mir -107	has-mir -112a	has-mir -112b	has-mir -112c.5p	has-mir -112d.5p	has-mir -112e	has-mir -112f.5p	has-mir -112g.5p	has-mir -112h.5p	has-mir -112i.5p	has-mir -112j.5p	has-mir -112k.5p
has-mir -130a	has-mir -132	has-mir -133a	has-mir -133b	has-mir -134	has-mir -135a	has-mir -135b	has-mir -136	has-mir -137	has-mir -138	has-mir -139.5p	has-mir -140.5p	has-mir -140.5p	has-mir -141	has-mir -142.5p	has-mir -142.5p	has-mir -143	has-mir -145	has-mir -146a	has-mir -146b.5p	has-mir -146c.5p	has-mir -147b
has-mir -148a	has-mir -149	has-mir -150	has-mir -152	has-mir -153	has-mir -154	has-mir -181a	has-mir -181c	RNA48	has-mir -183	has-mir -184	has-mir -185	has-mir -186	has-mir -187	has-mir -188.5p	has-mir -190	has-mir -191	has-mir -192	has-mir -193a.5p	has-mir -193b.5p	has-mir -193c	has-mir -194
has-mir -195	has-mir -196b	has-mir -197	has-mir -198	has-mir -199a.5p	has-mir -199b.5p	has-mir -200a	has-mir -200b	has-mir -202	has-mir -203	has-mir -204	has-mir -205	has-mir -206b	has-mir -210	has-mir -214	has-mir -215	has-mir -216b	has-mir -217	has-mir -218	has-mir -219	has-mir -221	has-mir -222
has-mir -223	has-mir -224	has-mir -225	has-mir -226	has-mir -227a.5p	has-mir -228.5p	has-mir -230a	has-mir -230b	atf-mir -199a	has-mir -202b	has-mir -202c	has-mir -202d	has-mir -202e	has-mir -202f	has-mir -202g	has-mir -202h	has-mir -202i	has-mir -202j	has-mir -202k	has-mir -202l	has-mir -202m	has-mir -202n
has-mir -335	has-mir -336	has-mir -337	has-mir -338	has-mir -339	has-mir -340	has-mir -341	has-mir -342	has-mir -343	has-mir -344	has-mir -345	has-mir -346	has-mir -347	has-mir -348	has-mir -349	has-mir -350	has-mir -351	has-mir -352	has-mir -353	has-mir -354	has-mir -355	has-mir -356
has-mir -374b	has-mir -375	has-mir -376a	has-mir -376b	has-mir -377	has-mir -378	has-mir -381	has-mir -382	has-mir -383	has-mir -384	has-mir -385	has-mir -386	has-mir -387	has-mir -388	has-mir -389	has-mir -390	has-mir -391	has-mir -392	has-mir -393	has-mir -394	has-mir -395	has-mir -396
has-mir -451	has-mir -452	has-mir -453	has-mir -454	has-mir -455.5p	has-mir -456.5p	has-mir -457	has-mir -458	has-mir -459	has-mir -460	has-mir -461	has-mir -462	has-mir -463	has-mir -464	has-mir -465	has-mir -466	has-mir -467	has-mir -468	has-mir -469	has-mir -470	has-mir -471	has-mir -472
has-mir -499.5p	has-mir -500	has-mir -501.5p	has-mir -502	has-mir -502.5p	has-mir -503	has-mir -504	has-mir -505	has-mir -506	has-mir -507	has-mir -508.5p	has-mir -509.5p	has-mir -510	has-mir -511.5p	has-mir -512.5p	has-mir -513.5p	has-mir -514.5p	has-mir -515.5p	has-mir -516a.5p	has-mir -516b	has-mir -517a	has-mir -517c
has-mir -518a.5p	has-mir -518b	has-mir -518c	has-mir -518d.5p	has-mir -518e	has-mir -518f	has-mir -519a	has-mir -519b	has-mir -519c	has-mir -519d	has-mir -519e	has-mir -519f	has-mir -519g	has-mir -519h	has-mir -519i	has-mir -519j	has-mir -519k	has-mir -519l	has-mir -519m	has-mir -519n	has-mir -519o	has-mir -519p
has-mir -541	has-mir -542	has-mir -543	has-mir -544	has-mir -545	has-mir -546	has-mir -547	has-mir -548	has-mir -549	has-mir -550	has-mir -551b	has-mir -551c	has-mir -551d	has-mir -551e	has-mir -551f	has-mir -551g	has-mir -551h	has-mir -551i	has-mir -551j	has-mir -551k	has-mir -551l	has-mir -551m
has-mir -589	has-mir -590	has-mir -591	has-mir -592	has-mir -593	has-mir -594	has-mir -595	has-mir -596	has-mir -597	has-mir -598	has-mir -599	has-mir -600	has-mir -601	has-mir -602	has-mir -603	has-mir -604	has-mir -605	has-mir -606	has-mir -607	has-mir -608	has-mir -609	has-mir -610
has-mir -611	has-mir -612	has-mir -613	has-mir -614	has-mir -615	has-mir -616	has-mir -617	has-mir -618	has-mir -619	has-mir -620	has-mir -621	has-mir -622	has-mir -623	has-mir -624	has-mir -625	has-mir -626	has-mir -627	has-mir -628	has-mir -629	has-mir -630	has-mir -631	has-mir -632
has-mir -633	has-mir -634	has-mir -635	has-mir -636	has-mir -637	has-mir -638	has-mir -639	has-mir -640	has-mir -641	has-mir -642	has-mir -643	has-mir -644	has-mir -645	has-mir -646	has-mir -647	has-mir -648	has-mir -649	has-mir -650	has-mir -651	has-mir -652	has-mir -653	has-mir -654
has-mir -655	has-mir -656	has-mir -657	has-mir -658	has-mir -659	has-mir -660	has-mir -661	has-mir -662	has-mir -663	has-mir -664	has-mir -665	has-mir -666	has-mir -667	has-mir -668	has-mir -669	has-mir -670	has-mir -671	has-mir -672	has-mir -673	has-mir -674	has-mir -675	has-mir -676
has-mir -677	has-mir -678	has-mir -679	has-mir -680	has-mir -681	has-mir -682	has-mir -683	has-mir -684	has-mir -685	has-mir -686	has-mir -687	has-mir -688	has-mir -689	has-mir -690	has-mir -691	has-mir -692	has-mir -693	has-mir -694	has-mir -695	has-mir -696	has-mir -697	has-mir -698
has-mir -699	has-mir -700	has-mir -701	has-mir -702	has-mir -703	has-mir -704	has-mir -705	has-mir -706	has-mir -707	has-mir -708	has-mir -709	has-mir -710	has-mir -711	has-mir -712	has-mir -713	has-mir -714	has-mir -715	has-mir -716	has-mir -717	has-mir -718	has-mir -719	has-mir -720
has-mir -721	has-mir -722	has-mir -723	has-mir -724	has-mir -725	has-mir -726	has-mir -727	has-mir -728	has-mir -729	has-mir -730	has-mir -731	has-mir -732	has-mir -733	has-mir -734	has-mir -735	has-mir -736	has-mir -737	has-mir -738	has-mir -739	has-mir -740	has-mir -741	has-mir -742
has-mir -743	has-mir -744	has-mir -745	has-mir -746	has-mir -747	has-mir -748	has-mir -749	has-mir -750	has-mir -751	has-mir -752	has-mir -753	has-mir -754	has-mir -755	has-mir -756	has-mir -757	has-mir -758	has-mir -759	has-mir -760	has-mir -761	has-mir -762	has-mir -763	has-mir -764
has-mir -765	has-mir -766	has-mir -767	has-mir -768	has-mir -769	has-mir -770	has-mir -771	has-mir -772	has-mir -773	has-mir -774	has-mir -775	has-mir -776	has-mir -777	has-mir -778	has-mir -779	has-mir -780	has-mir -781	has-mir -782	has-mir -783	has-mir -784	has-mir -785	has-mir -786
has-mir -787	has-mir -788	has-mir -789	has-mir -790	has-mir -791	has-mir -792	has-mir -793	has-mir -794	has-mir -795	has-mir -796	has-mir -797	has-mir -798	has-mir -799	has-mir -800	has-mir -801	has-mir -802	has-mir -803	has-mir -804	has-mir -805	has-mir -806	has-mir -807	has-mir -808
has-mir -809	has-mir -810	has-mir -811	has-mir -812	has-mir -813	has-mir -814	has-mir -815	has-mir -816	has-mir -817	has-mir -818	has-mir -819	has-mir -820	has-mir -821	has-mir -822	has-mir -823	has-mir -824	has-mir -825	has-mir -826	has-mir -827	has-mir -828	has-mir -829	has-mir -830
has-mir -831	has-mir -832	has-mir -833	has-mir -834	has-mir -835	has-mir -836	has-mir -837	has-mir -838	has-mir -839	has-mir -840	has-mir -841	has-mir -842	has-mir -843	has-mir -844	has-mir -845	has-mir -846	has-mir -847	has-mir -848	has-mir -849	has-mir -850	has-mir -851	has-mir -852
has-mir -853	has-mir -854	has-mir -855	has-mir -856	has-mir -857	has-mir -858	has-mir -859	has-mir -860	has-mir -861	has-mir -862	has-mir -863	has-mir -864	has-mir -865	has-mir -866	has-mir -867	has-mir -868	has-mir -869	has-mir -870	has-mir -871	has-mir -872	has-mir -873	has-mir -874
has-mir -875	has-mir -876	has-mir -877	has-mir -878	has-mir -879	has-mir -880	has-mir -881	has-mir -882	has-mir -883	has-mir -884	has-mir -885	has-mir -886	has-mir -887	has-mir -888	has-mir -889	has-mir -890	has-mir -891	has-mir -892	has-mir -893	has-mir -894	has-mir -895	has-mir -896
has-mir -897	has-mir -898	has-mir -899	has-mir -900	has-mir -901	has-mir -902	has-mir -903	has-mir -904	has-mir -905	has-mir -906	has-mir -907	has-mir -908	has-mir -909	has-mir -910	has-mir -911	has-mir -912	has-mir -913	has-mir -914	has-mir -915	has-mir -916	has-mir -917	has-mir -918
has-mir -919	has-mir -920	has-mir -921	has-mir -922	has-mir -923	has-mir -924	has-mir -925	has-mir -926	has-mir -927	has-mir -928	has-mir -929	has-mir -930	has-mir -931	has-mir -932	has-mir -933	has-mir -934	has-mir -935	has-mir -936	has-mir -937	has-mir -938	has-mir -939	has-mir -940
has-mir -941	has-mir -942	has-mir -943	has-mir -944	has-mir -945	has-mir -946	has-mir -947	has-mir -948	has-mir -949	has-mir -950	has-mir -951	has-mir -952	has-mir -953	has-mir -954	has-mir -955	has-mir -956	has-mir -957	has-mir -958	has-mir -959	has-mir -960	has-mir -961	has-mir -962
has-mir -963	has-mir -964	has-mir -965	has-mir -966	has-mir -967	has-mir -968	has-mir -969	has-mir -970	has-mir -971	has-mir -972	has-mir -973	has-mir -974	has-mir -975	has-mir -976	has-mir -977	has-mir -978	has-mir -979	has-mir -980	has-mir -981	has-mir -982	has-mir -983	has-mir -984
has-mir -985	has-mir -986	has-mir -987	has-mir -988	has-mir -989	has-mir -990	has-mir -991	has-mir -992	has-mir -993	has-mir -994	has-mir -995	has-mir -996	has-mir -997	has-mir -998	has-mir -999	has-mir -1000	has-mir -1001	has-mir -1002	has-mir -1003	has-mir -1004	has-mir -1005	has-mir -1006
has-mir -1007	has-mir -1008	has-mir -1009	has-mir -1010	has-mir -1011	has-mir -1012	has-mir -1013	has-mir -1014	has-mir -1015	has-mir -1016	has-mir -1017	has-mir -1018	has-mir -1019	has-mir -1020	has-mir -1021	has-mir -1022	has-mir -1023	has-mir -1024	has-mir -1025	has-mir -1026	has-mir -1027	has-mir -1028
has-mir -1029	has-mir -1030	has-mir -1031	has-mir -1032	has-mir -1033	has-mir -1034	has-mir -1035	has-mir -1036	has-mir -1037	has-mir -1038	has-mir -1039	has-mir -1040	has-mir -1041	has-mir -1042	has-mir -1043	has-mir -1044	has-mir -1045	has-mir -1046	has-mir -1047	has-mir -1048	has-mir -1049	has-mir -1050
has-mir -1051	has-mir -1052	has-mir -1053	has-mir -1054	has-mir -1055	has-mir -1056	has-mir -1057	has-mir -1058	has-mir -1059	has-mir -1060	has-mir -1061	has-mir -1062	has-mir -1063	has-mir -1064	has-mir -1065	has-mir -1066	has-mir -1067	has-mir -1068	has-mir -1069	has-mir -1070	has-mir -1071	has-mir -1072
has-mir -1073	has-mir -1074	has-mir -1075	has-mir -1076	has-mir -1077	has-mir -1078	has-mir -1079	has-mir -1080	has-mir -1081	has-mir -1082	has-mir -1083	has-mir -1084	has-mir -1085	has-mir -1086	has-mir -1087	has-mir -1088	has-mir -1089	has-mir -1090	has-mir -1091	has-mir -1092	has-mir -1093	has-mir -1094
has-mir -1095	has-mir -1096	has-mir -1097	has-mir -1098	has-mir -1099	has-mir -1100	has-mir -1101	has-mir -1102	has-mir -1103	has-mir -1104	has-mir -1105	has-mir -1106	has-mir -1107	has-mir -1108	has-mir -1109	has-mir -1110	has-mir -1111	has-mir -1112	has-mir -1113	has-mir -1114	has-mir -1115	has-mir -1116
has-mir -1117	has-mir -1118	has-mir -1119	has-mir -1120	has-mir -1121	has-mir -1122	has-mir -1123	has-mir -1124	has-mir -1125	has-mir -1126	has-mir -1127	has-mir -1128	has-mir -1129	has-mir -1130	has-mir -1131	has-mir -1132	has-mir -1133	has-mir -1134	has-mir -1135	has-mir -1136	has-mir -1137	has-mir -1138
has-mir -1139	has-mir -1140	has-mir -1141	has-mir -1142	has-mir -1143	has-mir -1144	has-mir -1145	has-mir -1146	has-mir -1147	has-mir -1148	has-mir -1149											

Abb. 29: TaqMan Human MicroRNA Array A.
(aus Information Card:Human MicroRNA Array v2.0, Life Technologies)

Tab. 5: Liste von 409 häufig mutierten Tumorsuppressor- und Onkogenen, die mittels Comprehensive Cancer Panel auf bekannte Mutations-Hotspots untersucht wurden.

Zielgene des Ion AmpliSeq Comprehensive Cancer Panels								
SEPT9	CARD11	DST	FOXP4	KDR	MUTYH	PIK3CB	SDHD	TSC1
ABL1	CASC5	EGFR	FZR1	KEAP1	MYB	PIK3CD	SETD2	TSC2
ABL2	CBL	EML4	G6PD	KIT	MYC	PIK3CG	SF3B1	TSHR
ACVR2A	CCND1	EP300	GATA1	KLF6	MYCL1	PIK3R1	SGK1	UBR5
ADAMTS20	CCND2	EP400	GATA2	KRAS	MYCN	PIK3R2	SH2D1A	UGT1A1
AFF1	CCNE1	EPHA3	GATA3	LAMP1	MYD88	PIM1	SMAD2	USP9X
AFF3	CD79A	EPHA7	GDNF	LCK	MYH11	PKHD1	SMAD4	VHL
AKAP9	CD79B	EPHB1	GNA11	LIFR	MYH9	PLAG1	SMARCA4	WAS
AKT1	CDC73	EPHB4	GNAQ	LPHN3	NBN	PLCG1	SMARCB1	WHSC1
AKT2	CDH1	EPHB6	GNAS	LPP	NCOA1	PLEKHG5	SMO	WRN
AKT3	CDH11	ERBB2	GPR124	LRP1B	NCOA2	PML	SMUG1	WT1
ALK	CDH2	ERBB3	GRM8	LTF	NCOA4	PMS1	SOCS1	XPA
APC	CDH20	ERBB4	GUCY1A2	LTK	NF1	PMS2	SOX11	XPC
AR	CDH5	ERCC1	HCAR1	MAF	NF2	POT1	SOX2	XPO1
ARID1A	CDK12	ERCC2	HIF1A	MAFB	NFE2L2	POU5F1	SRC	XRCC2
ARID2	CDK4	ERCC3	HLF	MAGEA1	NFKB1	PPARG	SSX1	ZNF384
ARNT	CDK6	ERCC4	HNF1A	MAGI1	NFKB2	PPP2R1A	STK11	ZNF521
ASXL1	CDK8	ERCC5	HOOK3	MALT1	NIN	PRDM1	STK36	
ATF1	CDKN2A	ERG	HRAS	MAML2	NKX2-1	PRKAR1A	SUFU	
ATM	CDKN2B	ESR1	HSP90AA1	MAP2K1	NLRP1	PRKDC	SYK	
ATR	CDKN2C	ETS1	HSP90AB1	MAP2K2	NOTCH1	PSIP1	SYNE1	
ATRX	CEBPA	ETV1	ICK	MAP2K4	NOTCH2	PTCH1	TAF1	
AURKA	CHEK1	ETV4	IDH1	MAP3K7	NOTCH4	PTEN	TAF1L	
AURKB	CHEK2	EXT1	IDH2	MAPK1	NPM1	PTGS2	TAL1	
AURKC	CIC	EXT2	IGF1R	MAPK8	NRAS	PTPN11	TBX22	
AXL	CKS1B	EZH2	IGF2	MARK1	NSD1	PTPRD	TCF12	
BAI3	CMPK1	FAM123B	IGF2R	MARK4	NTRK1	PTPRT	TCF3	
BAP1	COL1A1	FANCA	IKBKB	MBD1	NTRK3	RAD50	TCF7L1	
BCL10	CRBN	FANCC	IKBKE	MCL1	NUMA1	RAF1	TCF7L2	
BCL11A	CREB1	FANCD2	IKZF1	MDM2	NUP214	RALGDS	TCL1A	
BCL11B	CREBBP	FANCF	IL2	MDM4	NUP98	RARA	TET1	
BCL2	CRKL	FANCG	IL21R	MEN1	PAK3	RB1	TET2	
BCL2L1	CRTC1	FAS	IL6ST	MET	PALB2	RECQL4	TFE3	
BCL2L2	CSF1R	FBXW7	IL7R	MITF	PARP1	REL	TGFBR2	
BCL3	CSMD3	FGFR1	ING4	MLH1	PAX3	RET	TGM7	
BCL6	CTNNA1	FGFR2	IRF4	MLL	PAX5	RHOH	THBS1	
BCL9	CTNNB1	FGFR3	IRS2	MLL2	PAX7	RNASEL	TIMP3	
BCR	CYLD	FGFR4	ITGA10	MLL3	PAX8	RNF2	TLR4	
BIRC2	CYP2C19	FH	ITGA9	MLLT10	PBRM1	RNF213	TLX1	
BIRC3	CYP2D6	FLCN	ITGB2	MMP2	PBX1	ROS1	TNFAIP3	
BIRC5	DAXX	FLI1	ITGB3	MN1	PDE4DIP	RPS6KA2	TNFRSF14	
BLM	DCC	FLT1	JAK1	MPL	PDGFB	RRM1	TNK2	
BLNK	DDB2	FLT3	JAK2	MRE11A	PDGFRA	RUNX1	TOP1	
BMPR1A	DDIT3	FLT4	JAK3	MSH2	PDGFRB	RUNX1T1	TP53	

BRAF	DDR2	FN1	JUN	MSH6	PER1	SAMD9	TPR
BRD3	DEK	FOXL2	KAT6A	MTOR	PGAP3	SBDS	TRIM24
BRIP1	DICER1	FOXO1	KAT6B	MTR	PHOX2B	SDHA	TRIM33
BTK	DNMT3A	FOXO3	KDM5C	MTRR	PIK3C2B	SDHB	TRIP11
BUB1B	DPYD	FOXP1	KDM6A	MUC1	PIK3CA	SDHC	TRRAP

Tab. 6: Durchschnittliche Delta-Ct-Werte, Signifikanzen und Veränderungsfaktoren der differentiell exprimierten miRNAs.

Die am stärksten differentiell exprimierten miRNAs sind durch eine hervorgehobene Schrift dargestellt. FC: *Fold Change*, FDR: *false discovery rate*.

Expression	miRNA	durchschnittlicher Delta-Ct-Wert		p-Wert (FDR-Methode)	FC
		Angio- sarkome	Sarkome NOS/ Rhabdomyosarkom		
erhöht	let-7f	10,32	13,56	8,70E-04	9,55
	miR-10b	8,65	12,61	1,65E-02	15,49
	miR-126	-0,02	3,63	1,25E-03	12,59
	miR-130a	10,04	12,33	3,18E-02	4,9
	miR-139-5p	7,96	11,22	1,77E-02	9,55
	miR-146b-5p	6,39	14,22	4,56E-04	229,1
	miR-17	3,09	5,28	1,26E-02	4,57
	miR-18a	11,02	14,46	2,34E-03	10,96
	miR-19a	6,12	8,21	2,00E-02	4,27
	miR-19b	3,84	5,64	2,27E-02	3,55
	miR-20b	7,72	10,99	2,84E-02	9,55
	miR-28-3p	7,78	10,20	2,00E-02	5,37
	miR-330-3p	12,01	16,46	1,10E-02	21,88
	miR-331-3p	5,91	8,64	6,29E-03	6,61
	miR-362-5p	11,05	16,02	2,34E-03	31,62
	miR-372	11,12	16,39	1,79E-02	38,9
	miR-451	8,74	13,18	1,10E-02	21,88
	miR-486-5p	9,46	13,42	7,84E-03	15,48
	miR-503	13,91	16,16	5,00E-02	4,79
	miR-532-5p	8,33	12,03	9,23E-03	12,88
	miR-9	8,86	12,75	2,57E-02	14,79
reduziert	miR-137	15,88	9,04	1,78E-04	114,82
	miR-146b-3p	13,58	7,00	3,18E-02	95,5
	miR-28-5p	10,14	7,36	2,04E-02	6,92
	miR-29a	5,28	0,78	7,61E-04	22,39
	miR-339-5p	13,23	5,76	1,17E-05	177,83
	miR-362-3p	14,19	11,14	3,28E-02	8,32
	miR-450b-5p	15,70	5,88	1,92E-05	912
	miR-517b	16,28	10,91	1,92E-05	41,69
	miR-519a	14,31	5,93	3,04E-04	331,13
	miR-522	14,61	5,85	5,88E-06	436,52
	miR-542-5p	13,07	4,15	2,04E-06	478,63
	miR-627	16,28	10,20	1,92E-05	67,61
	miR-628-5p	12,40	7,96	1,15E-03	21,88

Tab. 7: Übersicht über die einzelnen tNGS-Läufe des Ion PGM Systems.

Fall	Gewebe	<i>reads</i>	generierte Sequenz in Mb	durchschnittliche Basen-Abdeckung	20-fache Abdeckung (%)
1	Tumor	$5,6 \cdot 10^6$	520	305	95,5
	Normal	$4,6 \cdot 10^6$	430	252	95,5
2	Tumor	$4,2 \cdot 10^6$	360	210	94,7
	Normal	$4,7 \cdot 10^6$	400	237	93,6
3	Tumor	$5,2 \cdot 10^6$	500	293	95,4
	Normal	$6,3 \cdot 10^6$	620	358	95,8
4	Tumor	$6,3 \cdot 10^6$	590	345	95,4
	Normal	$6,2 \cdot 10^6$	610	359	65,9
5	Tumor	$6,3 \cdot 10^6$	640	376	96,6
	Normal	$5,7 \cdot 10^6$	570	336	95,9
6	Tumor	$4,6 \cdot 10^6$	460	235	95,3
	Normal	$4,7 \cdot 10^6$	400	274	95,2

Tab. 8: Mittels Variant Caller identifizierte somatische Varianten der 6 kardialen Angiosarkome, die durch tNGS auf Mutationen untersucht wurden.UTR: untranslatierte Region, CDS: *coding DNA sequence*.

Fall	Chromosom	Position	Gen	Lokalisation	Referenz	Variante
1	chr1	204396745	PIK3C2B	Intron	G	A
	chr1	144886063	PDE4DIP	Intron	T	C
	chr1	36744887	MYH9	Intron	C	G
	chr2	223161624	PAX3	Intron	A	G
	chr2	48030838	MSH6	Intron	A	T
	chr2	29551161	ALK	Intron	G	A
	chr2	141625334	LRP1B	CDS	G	T
	chr2	212495315	ERBB4	CDS	G	T
	chr4	88056719	AFF1	Intron	G	T
	chr4	88052219	AFF1	Intron	T	C
	chr5	149433596	CSF1R	3' UTR	T	G
	chr5	55243435	IL6ST	Intron	A	G
	chr6	56484758	DST	CDS	C	T
	chr7	14017008	ETV1	Intron	C	G
	chr8	90965958	NBN	Intron	A	AA
	chr8	38274849	FGFR1	CDS	G	T
	chr9	8436703	PTPRD	Intron	C	G
	chr10	96522561	CYP2C19	CDS	T	C
	chr12	49434074	MLL2	Intron	C	A
	chr16	2105335	TSC2	Intron	C	G
	chr16	89813194	FANCA	Intron	C	T
	chr16	15838940	MYH11	Intron	G	C
	chr17	37829129	PGAP3	Intron	A	G
	chr17	53342796	HLF	5' UTR	G	GTTTC
	chr17	66519857	PRKAR1A	Intron	C	CT
	chr17	48272055	COL1A1	Intron	C	T
	chr19	1650134	TCF3	Intron	A	G
	chr19	3119406	GNA11	Intron	G	T
	chr19	45856468	ERCC2	Intron	G	C
	chr20	39795235	PLCG1	CDS	G	A
	chr22	39636946	PDGFB	Intron	A	T
2	chr1	45805866	MUTYH	Intron	G	A
	chr1	156785617	NTRK1	Intron	G	A
	chr1	186645927	PTGS2	Intron	C	T
	chr1	236978995	MTR	Intron	T	TGTCT
	chr1	115007039	TRIM33	Intron	A	AA
	chr1	85741968	BCL10	Intron	G	C
	chr1	115256530	NRAS	CDS	G	T
	chr2	141359287	LRP1B	Intron	C	T
	chr2	25463483	DNMT3A	Intron	G	A
	chr5	180048035	FLT4	Intron	T	C
	chr6	56425284	DST	Intron	A	G
	chr6	51695647	PKHD1	Intron	A	T

	chr6	106547372	PRDM1	Intron	C	G
	chr7	124492038	POT1	Intron	T	C
	chr8	114031445	CSMD3	Intron	A	AA
	chr9	139410177	NOTCH1	Intron	T	C
	chr9	98238379	PTCH1	CDS	A	G
	chr10	97975167	BLNK	Intron	GTATATA	GTATA
	chr10	76729558	KAT6B	Intron	C	T
	chr13	28609825	FLT3	Intron	A	G
	chr14	102550080	HSP90AA1	Intron	A	C
	chr14	81528412	TSHR	Intron	T	A
	chr16	65015908	CDH11	Intron	C	G
	chr17	78324048	RNF213	Intron	T	A
	chr22	42523683	CYP2D6	Intron	G	A
3	chr1	45805877	MUTYH	Intron	C	T
	chr2	25457312	DNMT3A	Intron	G	A
	chr4	62775487	LPHN3	Intron	G	A
	chr4	55964925	KDR	CDS	G	T
	chr5	180052870	FLT4	CDS	G	A
	chr5	35874575	IL7R	CDS	C	T
	chr7	124481245	POT1	Intron	G	A
	chr7	124481102	POT1	CDS	G	A
	chr9	8436703	PTPRD	Intron	C	G
	chr12	49416115	MLL2	CDS	G	A
	chr12	49438653	MLL2	CDS	G	A
	chr15	40938000	CASC5	Intron	G	A
	chr19	10610552	KEAP1	CDS	C	T
4	chr1	204396745	PIK3C2B	Intron	G	A
	chr1	144922048	PDE4DIP	Intron	C	CA
	chr2	223161624	PAX3	Intron	A	G
	chr3	52620778	PBRM1	Intron	A	T
	chr3	12645699	RAF1	CDS	G	A
	chr6	51503766	PKHD1	Intron	T	C
	chr6	117686943	ROS1	Intron	A	T
	chr6	51484348	PKHD1	Intron	G	A
	chr7	124486990	POT1	Intron	TCTTA	T
	chr7	91713018	AKAP9	Intron	A	T
	chr9	136913123	BRD3	Intron	C	G
	chr10	8115676	GATA3	Intron	A	T
	chr13	26967489	CDK8	Intron	C	T
	chr14	81574838	TSHR	Intron	C	T
	chr14	81574841	TSHR	Intron	T	C
	chr15	40942720	CASC5	Intron	T	G
	chr18	50985725	DCC	CDS	C	A
	chr19	1222012	STK11	Intron	G	C
	chr19	45856100	ERCC2	Intron	G	A
	chr20	31021250	ASXL1	CDS	C	T
	chr22	36744888	MYH9	Intron	C	G

5	chr22	33253292	TIMP3	Intron	C	T
	chr1	204413296	PIK3C2B	Intron	TCGG	T
	chr3	65439039	MAGI1	Intron	G	A
	chr3	65361377	MAGI1	Intron	G	A
	chr3	134644636	EPHB1	Intron	G	T
	chr3	52620781	PBRM1	Intron	A	T
	chr3	52620784	PBRM1	Intron	G	C
	chr3	37067050	MLH1	Intron	A	G
	chr5	149433596	CSF1R	3' UTR	T	G
	chr5	149433597	CSF1R	3' UTR	G	A
	chr6	134493471	SGK1	Intron	A	T
	chr7	2972136	CARD11	Intron	A	T
	chr7	91713018	AKAP9	Intron	A	T
	chr7	128845277	SMO	Intron	G	C
	chr8	90965958	NBN	Intron	A	AA
	chr8	103312390	UBR5	Intron	A	AA
	chr8	145741132	RECQL4	Intron	AG	A
	chr12	49421039	MLL2	CDS	G	A
	chr13	49051481	RB1	Intron	T	A
	chr14	81574841	TSHR	Intron	T	C
	chr14	105241378	AKT1	Intron	C	T
	chr16	23632816	PALB2	Intron	A	AA
	chr17	17118446	FLCN	Intron	G	GGCG
	chr17	76210367	BIRC5	5' UTR	G	C
	chr19	3119405	GNA11	Intron	T	G
	chr19	3110349	GNA11	Intron	T	G
	chr20	39795235	PLCG1	CDS	G	A
6	chr1	120469077	NOTCH2	Intron	T	C
	chr1	237048562	MTR	Intron	G	A
	chr1	45805882	MUTYH	Intron	C	T
	chr1	115251149	NRAS	Intron	C	T
	chr1	204433531	PIK3C2B	Intron	C	A
	chr2	29754744	ALK	Intron	G	T
	chr2	48032874	MSH6	Intron	ACTAT	A
	chr2	141253408	LRP1B	Intron	T	C
	chr3	138664408	FOXL2	3' UTR	C	T
	chr3	46482980	LTF	Intron	A	T
	chr3	187442643	BCL6	Intron	G	A
	chr4	55603451	KIT	Intron	G	A
	chr4	1808043	FGFR3	CDS	C	T
	chr4	55968172	KDR	CDS	G	A
	chr5	149503935	PDGFRB	Intron	G	A
	chr5	149514411	PDGFRB	CDS	C	T
	chr5	131923376	RAD50	CDS	G	A
	chr6	51618169	PKHD1	Intron	GT	G
	chr6	152793570	SYNE1	Intron	AAT	A
	chr6	31138371	POU5F1	Intron	G	A

chr6	152793412	SYNE1	Intron	C	A
chr7	142563707	EPHB6	Intron	C	T
chr7	128852135	SMO	CDS	C	T
chr8	113402844	CSMD3	Intron	ATTAACCTACACACATACAA	A
chr9	8436703	PTPRD	Intron	C	G
chr12	49444719	MLL2	CDS	G	A
chr14	99697608	BCL11B	Intron	C	T
chr15	74326767	PML	Intron	C	T
chr17	5424772	NLRP1	Intron	G	T
chr17	5487164	NLRP1	CDS	C	G
chr17	75316464	SEPT9	Intron	CCCCTGTC	C
chr17	48263021	COL1A1	Intron	C	T
chr18	25573660	CDH2	Intron	G	A
chr18	47802107	MBD1	Intron	G	A
chr19	3533275	FZR1	Intron	C	A
chr11	3740589	NUP98	Intron	A	T
chr11	3735009	NUP98	Intron	A	G

Tab. 9: Detaillierte Übersicht der 15 bestätigten missense- und nonsense Mutationen in 6 kardialen Angiosarkomen.

Fall	Mutation				
	Gen	Chromosom / Position	Exon	Variante	VarFreq (%)
1	LRP1B	2 / 141625334	27	c.4404C>A, p.Y1468*	20
	PLCG1	20 / 39795235	18	c.2120G>A, p.R707Q	24
	ERBB4	2 / 212495315	17	c.1951C>A, p.P651T	35
	FGFR1	8 / 38274849	12	c.1636C>A, p.N546K	41
2	NRAS	1 / 115256530	3	c.181C>A, p.Q61K	32
3	POT1	7 / 124481102	14	c.1294C>T, p.R432*	26
	MLL2	12/ 49438653	19	c.4837C>T, p.Q1613*	28
	MLL2	12 / 49416115	52	c.16360C>T, p.R5454*	44
	KDR	4 / 55964925	16	c.2312C>A, p.T771K	17
4	RAF1	3 / 12645699	7	c.770C>T, p.S257L	26
	ASXL1	20 / 31021250	11	c.1249C > T, p.R417*	35
	DCC	18 / 50985725	24	c.3516C > A, p.D1172Q	54
5	PLCG1	20 / 39795235	18	c.2120G>A, p.R707Q	14
	MLL2	12 / 49421039	48	c.14710C>T, p.R4904*	50
6	KDR	4 / 55968172	15	c.2158C>T, p.R720W	27

* Stop-Mutation; Darstellung der Aminosäuren im Einbuchstabencode

Literaturverzeichnis

1. **Fletcher, C. D. M., Unni, K. K. und Mertens, F.** Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. World Health Organization. *IARC, Lyon*.
2. **Moley, J. F. und Eberlein, T. J.** Soft-tissue sarcomas. *Surgical Clinics of North America*. 2000, 80:687-708.
3. **Cormier, J. N. und Pollock R. E.** Soft tissue sarcomas. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2004, 54:94-109.
4. **Pittenger, M. F. et al.** Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999, 284:143-147.
5. **Eid, J. E. und Garcia, C. B.** Reprogramming of mesenchymal stem cells by oncogenes. *Seminars in Cancer Biology*. 2014, doi: 10.1016/j.semcancer.2014.05.005.
6. **Mohseny, A. B. und Hogendoorn, P. C.** Concise Review: Mesenchymal Tumors: When Stem Cells Go Mad. *Cancer Stem Cells*. 2011, 29:397-403.
7. **Helman, L. J. und Meltzer, P.** Mechanisms of Sarcoma Development. *Nature Reviews Cancer*. 2003, 3:685-94.
8. **Welford, S. M. et al.** DNA Binding Domain-independent Pathways Are Involved in EWS/FLI1-mediated Oncogenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276:41977-84.
9. **Young, R. J. et al.** Angiosarcoma. *The Lancet Oncology*. 2010, 11:983-91.
10. **Beyeler, M. et al.** Mesenchymale Hauttumore: klinische Aspekte. *Schweizerisches Medizin-Forum*. 2004, 4:443-448.
11. **Penel, N. et al.** Angiosarcoma: State of the art and perspectives. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2011, 80:257-263.
12. **Patel, S. D. et al.** Primary cardiac angiosarcoma - a review. *Medical Science Monitor*. 2014, 20:103-9.
13. **Alberts, B. et al.** *Molecular Biology of the Cell, 5. Edition*. s.l. : Garland Science, 2008.
14. **Carmeliet, P. und Jain, R. K.** Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*. 2011, 473:298-307.
15. **Lamallice, L., Le Boeuf, F. und Huot, J.** Endothelial Cell Migration During Angiogenesis. *Circulation Research*. 2007, 100:782-794.
16. **Shibuya, M.** Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. 2013, 153:13-19.
17. **Neufeld, G. et al.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*. 1999, 13:9-22.
18. **Nishida, N. et al.** Angiogenesis in cancer. *Vascular Health and Risk Management*. 2006, 2:213-219.

19. **Weis, S. M. und Cheresch, D. A.** Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nature Medicine*. 2011, 17:1359-70.
20. **Siemann, D. W.** The Unique Characteristics of Tumor Vasculature and Preclinical Evidence for its Selective Disruption by Tumor-Vascular Disrupting Agents. *Cancer Treatment Reviews*. 2011, 37:63-74.
21. **Arbiser, J. L. et al.** Overexpression of VEGF 121 in immortalized endothelial cells causes conversion to slowly growing angiosarcoma and high level expression of the VEGF receptors VEGFR-1 and VEGFR-2 in vivo. *The American Journal of Pathology*. 2000, 156:1469-76.
22. **Zietz, C. et al.** MDM-2 Oncoprotein Overexpression, p53 Gene Mutation, and VEGF Up-Regulation in Angiosarcomas. *American Journal of Pathology*. 1998, 153:1425-33.
23. **Yonemori, K. et al.** Contrasting prognostic implications of platelet-derived growth factor receptor- β and vascular endothelial growth factor receptor-2 in patients with angiosarcoma. *Annals of Surgical Oncology*. 2011, 18: 2841-2850.
24. **Antonescu, C. R. et al.** KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to specific kinase inhibitors. *Cancer Research*. 2009, 69:7175-9.
25. **Naka, N. et al.** Mutations of p53 tumor-suppressor gene in angiosarcoma. *International Journal of Cancer*. 1997, 71:952-5.
26. **Weihrauch, M. et al.** Mutation analysis of K-ras-2 in liver angiosarcoma and adjacent nonneoplastic liver tissue from patients occupationally exposed to vinyl chloride. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2002, 40:36-40.
27. **Behjati, S. et al.** Recurrent PTPRB and PLCG1 mutations in angiosarcoma. *Nature Genetics*. 2014, 46:376-9.
28. **Baumhoer, D. et al.** Comparative genomic hybridization in four angiosarcomas of the female breast. *Gynecologic Oncology*. 2005, 97:348-352.
29. **Butany, J. et al.** Cardiac tumours: diagnosis and management. *Lancet Oncology*. 2005, 6:219-28.
30. **Kubota, Y.** Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy. *The Keio Journal of Medicine*. 2012, 61:47-56.
31. **Agulnik, M. et al.** An open-label, multicenter, phase II study of bevacizumab for the treatment of angiosarcoma and epithelioid hemangioendotheliomas. *Annals of Oncology*. 2013, 24:257-263.
32. **Maki, R. G. et al.** Phase II study of sorafenib in patients with metastatic or recurrent sarcomas. *Journal of Clinical Oncology*. 2009, 27:3133-40.
33. **Arbiser, J. L. et al.** The antiangiogenic agents TNP-470 and 2-methoxyestradiol inhibit the growth of angiosarcoma in mice. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 1999, 40:925-9.
34. **Yamamoto, T., Sudo, K. und Fujita, T.** Significant inhibition of endothelial cell growth in tumor vasculature by an angiogenesis inhibitor, TNP-470 (AGM-1470). *Anticancer Research*. 1994, 14:1-3.
35. **Kruger, E. A. und Figg, W. D.** TNP-470: an angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2000, 9:1383-1396.

36. **Yeh, J. R, Mohan, R. und Crews, C. M.** The antiangiogenic agent TNP-470 requires p53 and p21CIP/WAF for endothelial cell growth arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000, 97:12782-7.
37. **Mabjeesh, N. J. et al.** 2ME2 inhibits tumor growth and angiogenesis by disrupting microtubules and dysregulating HIF. *Cancer Cell*. 2003, 3:363-75.
38. **Vogt, T. et al.** Antiangiogenetic therapy with pioglitazone, refecoxib and metronomic trofosamide in patients with advanced malignant vascular tumors. *Cancer*. 2003, 98:2251-6.
39. **Look Hong, N. J. et al.** Cardiac Angiosarcoma Management and Outcomes: 20-Year Single-institution Experience. *Annals of Surgical Oncology*. 2012, 19:2707-15.
40. **Garcia, J. M. et al.** Mutational status of K-ras and TP53 genes in primary sarcomas of the heart. *British Journal of Cancer*. 2000, 82:1183-1185.
41. **Neuville, A. et al.** Intimal sarcoma is the most frequent primary cardiac sarcoma: clinicopathologic and molecular retrospective analysis of 100 primary cardiac sarcomas. *The American Journal of Surgical Pathology*. 2014, 38:461-9.
42. **Zu, Y. et al.** Chromosomal Abnormalities and p53 Gene Mutation in a Cardiac Angiosarcoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2001, 9:24-28.
43. **Oh, S. J., Yeom, S. Y. und Kim, K. H.** Clinical implication of surgical resection for the rare cardiac tumors involving heart and great vessels. *Journal of Korean Medical Science*. 2013, 28:717-24.
44. **Vogelstein, B., Lane, D. und Levine, A. J. .** Surfing the p53 network. *Nature*. 2000, 408:307-10.
45. **Pareek, C. S. und Smoczynski, R.** Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*. 2011, 52:413-435.
46. **Vogelstein, B. et al.** Cancer Genome Landscapes. *Science*. 2013, 339:1546-58.
47. **Neveling, K. und Hoischen, A.** Einführung in die Grundlagen der Hochdurchsatzsequenzierung. *Medizinische Genetik*. 2014, 26:231-238.
48. **Morozova, O. und Marra, M. A.** Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*. 2008, 92:255-264.
49. **van Dijk, E. L. et al.** Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*. 2014, 30:418-26.
50. **Guan, Y. F. et al.** Application of next-generation sequencing in clinical oncology to advance personalized treatment of cancer. *Chinese Journal of Cancer*. 2012, 31:463-70.
51. **Teer, J. K. und Mullikin, J. C.** Exome sequencing: the sweet spot before whole genomes. *Human Molecular Genetics*. 2010, 19:R145-51.
52. **Bentley, D. R. et al.** Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*. 2008, 456:53-9.
53. **Koboldt, D. C. et al.** The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*. 2013, 155:27-38.
54. **Kerick, M., Timmermann, B. und Schweiger, M. R.** High-throughput sequencing of frozen and paraffin-embedded tumor and normal tissue. *Der Pathologe*. 2010, 2:255-7.

55. **LaFramboise, T. et al.** Allele-Specific Amplification in Cancer Revealed by SNP Array Analysis. *PLoS Computational Biology*. 2005, 1:e65.
56. **International HapMap Consortium.** The International HapMap Project. *Nature*. 2003, 426:789-96.
57. **LaFramboise, T.** Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances. *Nucleic Acids Research*. 2009, 37:4181-93.
58. **Jansson, M. D. und Lund, A. H.** MicroRNA and cancer. *Molecular Oncology*. 2012, 6:590-610.
59. **Friedländer, M. R. et al.** Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genom Biology*. 2014, 15:R57.
60. **Iorio, M. V. und Croce, C. M.** MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostic, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine*. 2012, 4:143-159.
61. **Nancarrow, D. J. et al.** SiDCoN: A Tool to Aid Scoring of DNA Copy Number Changes in SNP Chip Data. *PLoS ONE*. 2007, 2:e1093.
62. **Chen, C. et al.** Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2005, 33:e179.
63. **Kutyavin, I. V. et al.** 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Research*. 2000, 28:655-61.
64. **Verducci, J. S. et al.** Microarray analysis of gene expression: considerations in data mining and statistical treatment. *Physiological Genomics*. 2006, 25:355-63.
65. **Bronner, I. F. et al.** Improved Protocols for Illumina Sequencing. *Current Protocols in Human Genetics*. 2013, 79:18.2.1-18.2.42.
66. **Paithankar, K. R. und Prasad, K. S. N.** Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Research*. 1991, 19:1346.
67. **Rothberg, J. M. et al.** An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*. 2011, 475:348-52.
68. **Berridge M. J.** Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009, 1793:933-40.
69. **Polette, M. et al.** Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2004, 49:179-86.
70. **Futreal, A. P.** A census of human cancer genes. *Nature Reviews Cancer*. 2004, 4:177-183.
71. **Schaaf, C. P. und Zschocke, J.** *Basiswissen Humangenetik, 2. Auflage*. Berlin : Springer, 2012. 978-3-642-28906-4.
72. **Guo, C. et al.** Global identification of MLL2-targeted loci reveals MLL2's role in diverse signaling pathways. *PNAS*. 2012, 109:17603-8.
73. **Lawrence, M. S. et al.** Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. 2014, 505:495-501.
74. **Gresset, A. et al.** Mechanism of phosphorylation-induced activation of phospholipase C-gamma isozymes. *The Journal of biological chemistry* . 2010, 285:35836-47.

75. **Poulin, B. et al.** Intramolecular interaction between phosphorylated tyrosine-783 and the C-terminal Src homology 2 domain activates phospholipase C-gamma1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005, 102:4276-81.
76. **Park, J. B. et al.** Phospholipase signaling networks in cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2012, 12:782-92.
77. **Kadamur, G. et al.** Mammalian Phospholipase C. *Annual Review of Physiology*. 2013, 75:127-54.
78. **Schabbauer, G. et al.** Nuclear factor of activated T cells and early growth response-1 cooperate to mediate tissue factor gene induction by vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2007, 97:988-97.
79. **Crabtree, G. R. und Olson, E. N.** NFAT Signaling: Choreographing the Social Lives of Cells. *Cell*. 2002, 109:67-79.
80. **Takahashi, T. et al.** A single autophosphorylation site on KDR/FLK-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC- γ and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO Journal*. 2001, 20:2768-78.
81. **Wang, X. T. et al.** Oxidative stress induced phospholipase C-gamma 1 activation enhances cell survival. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001, 276:28364-71.
82. **Bai, X. C. et al.** Phospholipase C gamma1 is required for cell survival in oxidative stress by protein kinase C. *Biochemical Journal*. 2002, 363:395-401.
83. **Liu, X. et al.** Src homology domains in phospholipase C- γ 1 mediate its anti-apoptotic action through regulating the enzymatic activity. *Journal of Neurochemistry*. 2005, 93:892-8.
84. **Lattanzio, R. et al.** Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis. *Advances in Biological Regulation*. 2013, 53:309-18.
85. **Wells, A. et al.** Phospholipase C-gamma1 in tumor progression. *Clinical and Experimental Metastasis*. 2003, 20:285-90.
86. **Piccolo, E. et al.** The mechanism involved in the regulation of phospholipase Cgamma1 activity in cell migration. *Oncogene*. 2002, 21:6520-9.
87. **Wang, W. et al.** The cofilin pathway in breast cancer invasion and Metastasis. *Nature Reviews Cancer*. 2007, 7:429-40.
88. **Bravo-Cordero, J. J. et al.** Functions of cofilin in cell locomotion and invasion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2013, 14:405-15.
89. **Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B.** Genetic instabilities in human cancers. *Nature*. 1998, 396:643-9.
90. **Segers, H. et al.** Gain of 1q is a marker of poor prognosis in Wilms' tumors. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2013, 52:1065-74.
91. **Holmes, K. et al.** Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling*. 2007, 19:2003-12.
92. **Shalom-Feuerstein, R. et al.** Pluripotent stem cell model reveals essential roles for miR-450b-5p and miR-184 in embryonic corneal lineage specification. *Stem Cells*. 2012, 30:898-909.

93. **Sun, M. M. et al.** TGF- β 1 suppression of microRNA-450b-5p expression: a novel mechanism for blocking myogenic differentiation of rhabdomyosarcoma. *Oncogene*. 2014, 33:2075-2086.
94. **Zong, X. et al.** Possible role of Pax-6 in promoting breast cancer cell proliferation and tumorigenesis. *BMB Reports*. 2011, 44:595-600.
95. **Li, Y. et al.** PAX6, a novel target of microRNA-7, promotes cellular proliferation and invasion in human colorectal cancer cells. *Digestive Diseases and Sciences*. 2014, 59:598-606.
96. **Al-Kahlaf, H. H. und Aboussekhra, A.** MicroRNA-141 and MicroRNA-146b-5p Inhibit the pro-Metastatic Mesenchymal Characteristics through the RNA Binding Protein AUF1 Targeting the Transcription Factor ZEB1 and the Protein Kinase AKT. *The Journal of Biological Chemistry*. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.593004.
97. **Geraldo, M. V. , Yamashita, A. S. und Kimura, E. T.** MicroRNA miR-146b-5p regulates signal transduction of TGF- β by repressing SMAD4 in thyroid cancer. *Oncogene*. 2012, 31:1910-22.
98. **Italiano, A. et al.** The miR-17-92 Cluster and Its Target THBS1 Are Differentially Expressed in Angiosarcomas Dependent on MYC Amplification. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2012, 51:569-578.
99. **Lawler, P. R. und Lawler, J.** Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2012, 2:a006627.
100. **Sarver, A. L. et al.** S-MED: Sarcoma microRNA Expression Database. *Laboratory Investigation*. 2010, 90:753-761.
101. **Jones, P. A. und Baylin, S. B.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics*. 2002, 3:415-28.
102. **Müller-Tidow, C. et al.** Tyrosinkinasen als Ziele neuer onkologischer Therapien. *Deutsches Ärzteblatt*. 2007, 104:A1312-9.
103. **Li, A. et al.** Activated mutant NRas(Q61K) drives aberrant melanocyte signaling, survival, and invasiveness via a Rac1-dependent mechanism. *The Journal of Investigative Dermatology*. 2012, 132:2610-21.
104. **Dhandapany, P. S. et al.** Cyclosporine attenuates cardiomyocyte hypertrophy induced by RAF1 mutants in Noonan and LEOPARD syndromes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2011, 51:4-15.
105. **Lew, E. D. et al.** The Precise Sequence of FGF Receptor Autophosphorylation Is Kinetically Driven and Is Disrupted by Oncogenic Mutations. *Science Signaling*. 2009, 2:ra6.
106. **Sandoval, J. und Esteller, M.** Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current Opinion in Genetics & Development*. 2012, 22:50-55.
107. **Ansari, K. I. und Mandal, S. S.** Mixed lineage leukemia: roles in gene expression, hormone signaling and mRNA processing. *The FEBS Journal*. 2010, 277:1790-804.
108. **Morin, R. D. et al.** Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature*. 2011, 476:298-303.
109. **Lodish, H. et al.** *Molecular Cell Biology, 4th edition*. New York : W. H. Freeman, 2000. ISBN-10: 0-7167-3136-3.

110. **Gelsi-Boyer, V. et al.** Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *Journal of Hematology and Oncology*. 2012, 5:12.
111. **Shih, A. H. et al.** The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nature Reviews Cancer*. 2012, 12:599-612.
112. **Gelsi-Boyer, V. et al.** Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2009, 145:788-800.
113. **Vaqu  , J. P. et al.** PLCG1 mutations in cutaneous T-cell lymphomas. *Blood*. 2014, 123:2034-43.
114. **Hernández, G. L. et al.** Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *The Journal of Experimental Medicine*. 2001, 193:607--20.
115. **Chen, P. et al.** Epidermal growth factor receptor-mediated cell motility: phospholipase C activity is required, but mitogen-activated protein kinase activity is not sufficient for induced cell movement. *The Journal of Cell Biology*. 1994, 127:847-57.
116. **Klein, R. R. et al.** Direct activation of human phospholipase C by its well known inhibitor u73122. *The Journal of Biological Chemistry*. 2011, 286:12407-16.
117. **Zhang, W. und Liu, H. T.** MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*. 2002, 12:9-18.
118. **Mackay, H. J. und Twelves, C. J.** Targeting the protein kinase C family: are we there yet? *Nature Reviews Cancer*. 2007.
119. **Xue, W. et al.** CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. *Nature*. 2014, 514:380-384.
120. **Hsu, P. D. et al.** Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*. 2014, 157:1263-78.

Lebenslauf

Publikationen

Kunze, K., Spieker, T., Gamedinger, U., Nau, K., Berger, J., Dreyer, T., Sindermann, J.R., Hoffmeier, A., Gattenlöhner, S., Bräuninger, A. A Recurrent Activating PLCG1 Mutation in Cardiac Angiosarcomas Increases Apoptosis Resistance and Invasiveness of Endothelial Cells. *Cancer Research*. 2014, 74:6173-6183.

Kunze, K., Gamedinger, U., Leßig-Owlanj, J., Sorokina, M., Brobeil, A., Tur, M.K., Blau, W., Burchardt, A., Käbisch, A., Schliesser, G., Kiehl, M., Rosenwald, A., Rummel, M., Grimminger, F., Hain, T., Chakraborty, T., Bräuninger, A., Gattenlöhner, S. Detection of an activated JAK3 variant and a Xq26.3 microdeletion causing loss of PHF6 and miR-424 expression in myelodysplastic syndromes by combined targeted next generation sequencing and SNP array analysis. *Pathology, Research and Practice*. 2014, 210:369-76.

Kunze, K., Frank, M., Bodner, J., Reichert, M., Blau, W., Sibelius, U., Rummel, M., Hörbelt, R., Padberg, W., Engenhart-Cabillic, R., Bräuninger, A., Gattenlöhner, S. Differentiation of primary and metastatic tumours in synchronous multifocal colonic and bronchopulmonary adenocarcinoma by targeted next-generation sequencing. *Histopathology*. 2014, 64:1041-3.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die mich während der Promotion begleitet und unterstützt haben. Besonderer Dank gilt...

...Prof. Dr. Bräuninger für die Bereitstellung des interessanten Themas, der nötigen Mittel sowie für die engagierte Betreuung während der Forschungsarbeiten und dem Anfertigen der Dissertation.

...Prof. Dr. Dammann für die Übernahme der externen Betreuung durch den Fachbereich Biologie und die Erstellung des Erstgutachtens.

...Prof. Dr. Bindereif und Prof. Dr. Menke für die Beteiligung an der Disputation als Prüfer.

...allen Mitarbeitern der AG Bräuninger für die herzliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima sowie für die große Hilfsbereitschaft bei der Entstehung der Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei Kerstin Nau für das Korrekturlesen der Arbeit.

...insbesondere meinen Eltern, die immer an mich glaubten.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum

Unterschrift

